

**DIE HPLC-ANALYSE DER SAPONINDROGEN
HIPPOCASTANI SEMEN, PRIMULAE RADIX
UND HEDERAE FOLIUM UND DARAUS
HERGESTELLTER ARZNEIPRÄPARATE**

HARALD REGER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die HPLC-Analyse der Saponindrogen Hippocastani semen,
Primulae radix und Hederae folium
und daraus hergestellter Arzneipräparate

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Harald Reger
aus
München

Januar 1987

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wagner
 2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Severin
- Tag der mündlichen Prüfung: 19.2.1987

Meinen Eltern und Angelika gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
<u>I. ALLGEMEINER TEIL</u>	2
1. <u>STRUKTURELLE EINORDNUNG DER BEHANDELTEN SAPONINE</u>	2
2. <u>BIOLOGISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN</u>	3
3. <u>BISHERIGER STAND DER ANALYTIK</u>	6
4. <u>ALLGEMEINE ANMERKUNGEN ZUR HPLC-ANALYSE VON SAPONINEN</u>	9
<u>II. SPEZIELLER TEIL</u>	12
1. <u>HIPPOCASTANI SEMEN UND AESCIN</u>	12
1.1 <u>Botanische Einordnung und Bedeutung</u>	12
1.2 <u>Inhaltsstoffe des Roßkastaniensamens</u>	12
1.2.1 <u>Chemie der Aesculus-Saponine</u>	12
1.2.2 <u>Weitere bekannte Inhaltsstoffe</u>	15
1.3 <u>Pharmakologische Eigenschaften von Aescin und</u> <u>Roßkastanienextrakten</u>	16
1.4 <u>Bisherige Bestimmungsmethoden</u>	17
1.5 <u>HPLC-Analyse von β-Aescin</u>	19
1.5.1 <u>Trennung von Aescin in verschiedenen Trennsystemen</u>	19
1.5.1.1 <u>Trennung auf C_{18}-Umkehrphasen (RP 18)</u>	19
1.5.1.2 <u>Trennung auf C_8- und C_2-Umkehrphasen (RP 8, RP 2)</u>	22
1.5.1.3 <u>Trennung auf einer DIOL-Phase</u>	22
1.5.1.4 <u>Trennversuch auf einer Cyano-Phase</u>	23
1.5.1.5 <u>Temperaturabhängigkeit der Saponintrennung</u>	23
1.5.2 <u>Strukturelle Zuordnungen der Peaks der</u> <u>Aescin-Trennung</u>	25
1.6 <u>HPLC-Analyse von Roßkastaniensamenextrakten und</u> <u>-zubereitungen</u>	29
1.6.1 <u>Probenvorbereitung und HPLC-Trennung</u>	29
1.6.2 <u>Strukturelle Zuordnung der Extraktpeaks</u>	32

<u>1.7 Quantitative Untersuchungen</u>	36
1.7.1 Quantitativer Vergleich verschiedener Aescin- Chargen.....	36
1.7.2 Fingerprintanalyse und quantitativer Vergleich verschiedener Roßkastaniensamenextrakte und Fertigarzneimittel.....	38
1.7.3 Bestimmung des Gesamtsaponingehalts über die Deacylsaponine.....	43
1.7.3.1 Vorausgehende Untersuchungen.....	43
1.7.3.2 Eichgeraden, Standardkorrekturfaktor, Wiederfin- dungsrate.....	47
1.7.3.3 Bestimmung des Gesamtsaponingehalts von Extrakten und Fertigarzneimitteln.....	49
1.7.3.4 Vergleich der HPLC-Bestimmung mit der Bestim- mungsmethode des DAB 8	51
<u>1.8 Strukturelle Untersuchungen an Aescinfraktionen</u>	53
1.8.1 Charakterisierung von Fraktionen aus kristallinem β-Aescin (Doppelpeaks A/B und C/D).....	53
1.8.1.1 Isolierung.....	53
1.8.1.2 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Substanzen A/B und C/D.....	55
1.8.1.3 FAB-massenspektrometrische Untersuchungen der Substanzen A/B und C/D.....	57
1.8.2 Charakterisierung von Fraktionen aus Deacylaescin..	60
1.8.2.1 Isolierung.....	60
1.8.2.2 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von Fraktion 3 und 4/5/6.....	60
1.8.2.3 FAB-massenspektrometrische Untersuchung von Fraktion 3.....	63
<u>2. PRIMULAE RADIX</u>	65
<u>2.1 Botanik</u>	65
2.1.1 Systematik und Verbreitung.....	65
2.1.2 Botanische Beschreibung.....	65
<u>2.2 Inhaltsstoffe von Primulae radix</u>	66
2.2.1 Chemie der Primulasaponine.....	66

2.2.2 Weitere Inhaltsstoffe.....	68
2.3 Pharmakologische Eigenschaften von <i>Primulae radix</i>	69
2.4 Bisherige Bestimmungsmethoden für <i>Primulasaponine</i>	70
2.5 HPLC-Analyse von <i>Primula</i> -Extrakten.....	71
2.5.1 Trennsystem und Probenvorbereitung.....	71
2.5.2 HPLC-Trennung von <i>Primulae-radix</i> -Extrakten.....	73
2.5.3 Temperaturabhängigkeit der Trennung.....	77
2.6 Isolierung und Identifizierung der <i>Primulasaponine</i> ...	79
2.6.1 Vorversuche.....	79
2.6.2 Isolierung von <i>Primulasaponin 1</i> und <i>2</i>	80
2.6.3 Strukturelle Untersuchungen an <i>Saponin 1</i> und <i>2</i>	81
2.6.3.1 DC-Untersuchungen.....	81
2.6.3.2 GC-Untersuchungen der Zuckeranteile.....	83
2.6.3.3 FAB-MS von <i>Saponin 1</i> und <i>2</i>	84
2.6.3.4 Bestimmung der Zuckersequenz und -verknüpfung in <i>Saponin 2</i>	88
2.6.3.5 Partialhydrolyse.....	94
2.6.3.6 Massenspektrometrie von permethyliertem <i>Saponin 2</i>	96
2.7 HPLC-Analyse der <i>Phenolglykoside</i>	98
2.7.1 HPLC-Trennung.....	98
2.7.2 Identifizierung der <i>Phenolglykoside</i>	99
2.7.2.1 DC und Mikrohydrolyse der isolierten Substanz....	100
2.7.2.2 FAB-MS der isolierten Substanz.....	101
2.8 Quantitative Untersuchungen.....	101
2.8.1 Gehaltsbestimmung der <i>Primulasaponine</i>	101
2.8.1.1 Standardkorrekturfaktor, Eichgerade, Reprodu- zierbarkeit und Nachweisgrenzen.....	101
2.8.1.2 Bestimmung von <i>Primula</i> -Extrakten und Zuberei- tungen.....	103
2.8.1.3 Vergleich mit anderen Methoden.....	105
2.8.2 Bestimmung der <i>Phenolglykoside</i> und deren <i>Aglykone</i> ..	106
2.8.2.1 Modelltrennung und Erstellung einer Eichtablelle..	106
2.8.2.2 Bestimmung von Extrakten.....	108

<u>3. HEDERAE FOLIUM</u>	110
<u>3.1 Verbreitung und botanische Einordnung</u>	110
<u>3.2 Inhaltsstoffe von Hedera helix</u>	110
<u>3.2.1 Chemie der Hederasaponine</u>	110
<u>3.2.2 Weitere Inhaltsstoffe</u>	112
<u>3.3 Pharmakologie</u>	112
<u>3.4 Bisherige Bestimmungsmethoden</u>	113
<u>3.5 HPLC-Analyse von Extrakten und Fertigarzneimitteln</u> ...	113
<u>3.5.1 Trennsystem und Probenvorbereitung</u>	113
<u>3.5.2 HPLC-Trennungen von Hedera-Extrakten</u>	115
<u>3.5.2.1 Saponine</u>	115
<u>3.5.2.1 Fingerprintanalyse der phenolischen Verbindungen</u> <u>(Kaffeesäurederivate und Rutin)</u>	118
<u>3.6 Isolierung und Identifizierung der Saponine</u>	121
<u>3.6.1 Isolierung von Hederacosid C, α-Hederin, Saponin X</u> <u>sowie Hederacosid B</u>	121
<u>3.6.2 Identifizierung der Saponine</u>	122
<u>3.6.2.1 DC-Untersuchungen</u>	122
<u>3.6.2.2 FAB-MS der Hederasaponine</u>	125
<u>3.7.1 Quantitative Bestimmung der Hederasaponine</u>	127
<u>3.7.1.1 Eichgeraden, Standardkorrekturfaktoren, Reprodu-</u> <u>zierbarkeit und Nachweisgrenzen</u>	128
<u>3.7.1.2 Bestimmung von Extrakten und Fertigarzneimitteln</u> ...	129
<u>3.7.1.3 Vergleich mit anderen Bestimmungsmethoden</u>	132
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	133

<u>III. EXPERIMENTELLER TEIL</u>	136
<u>1. HERKUNFT DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS UND DER VERGLEICHSSUBSTANZEN</u>	136
1.1 <u>Drogen</u>	136
1.2 <u>Trockenextrakte</u>	137
1.3 <u>Fluidextrakte und Tinkturen</u>	137
1.4 <u>Fertigarzneimittel</u>	138
1.5 <u>Vergleichssubstanzen</u>	138
<u>2. CHEMISCHE METHODEN</u>	139
2.1 <u>Hydrolysen</u>	139
2.1.1 <u>Mikrohydrolyse mit HCl-Dampf</u>	139
2.1.2 <u>Trifluoressigsäure-Hydrolyse</u>	139
2.1.3 <u>Enzymatische Hydrolyse</u>	139
2.1.4 <u>Partialhydrolyse</u>	140
2.2 <u>Derivatisierungen</u>	140
2.2.1 <u>Darstellung der Alditolacetate</u>	140
2.2.2 <u>Permethylierung</u>	141
2.2.3 <u>Darstellung der methylierten Alditolacetate</u>	141
<u>3. ISOLIERUNGEN</u>	141
3.1 <u>Isolierung von Primulasaponin 1 und 2</u>	141
3.2 <u>Isolierung von Primverin</u>	142
3.3 <u>Isolierung von Hederacosid C, α-Hederin sowie Hederasaponin X</u>	143
3.3.1 <u>Hederacosid C</u>	143
3.3.2 <u>α-Hederin</u>	144
3.3.3 <u>Saponin X</u>	144
3.4 <u>Isolierung von Fraktionen aus β-Aescin</u>	144
3.5 <u>Isolierung von Fraktionen aus Deacylaescin</u>	144
<u>4. CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN</u>	145
4.1 <u>Analytische Dünnschichtchromatographie</u>	145
4.1.1 <u>Adsorbentien</u>	145
4.1.2 <u>Laufmittelsysteme</u>	145

4.1.3 Detektionsmittel.....	146
4.2 Präparative Dünnschichtchromatographie.....	146
4.3 Gelchromatographie.....	147
4.4 Gaschromatographie.....	147
4.5 Hochdruckflüssigchromatographie.....	147
4.5.1 Apparative Daten.....	147
4.5.2 Trennsysteme.....	148
4.5.3 Qualitative und quantitative Analyse von Hippocastani semen.....	151
4.5.3.1 Probenvorbereitung.....	151
Angaben zur quantitativen Bestimmung.....	153
4.5.4 Qualitative und quantitative Analyse von Primulae radix.....	154
4.5.4.1 Probenvorbereitung.....	154
4.5.4.2 Angaben zur quantitativen Bestimmung.....	156
4.5.5 Qualitative und quantitative Analyse von Hederae folium.....	157
4.5.5.1 Probenvorbereitung.....	157
4.5.5.2 Angaben zur quantitativen Bestimmung.....	158
4.5.6 Integration.....	160
4.5.7 Berechnung.....	160
5. SPEKTROSKOPISCHE METHODEN.....	161
5.1 Massenspektrometrie.....	161
5.2 UV-Spektren.....	161
6. MESSDATEN.....	162
ANHANG.....	166
LITERATURVERZEICHNIS.....	167

EINLEITUNG

Alle bisher verwendeten und auch in die Arzneibücher aufgenommenen Analysenmethoden von Saponindrogen beruhen auf biologischen oder chemischen Verfahren. Die seit kurzem auch in die Saponinanalytik eingeführte HPLC-Analyse bietet demgegenüber so große Vorteile, daß sie als die Methode der Zukunft in der Drogenanalytik ganz allgemein anzusehen ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine auf saponinhaltige Drogenextrakte und Fertigarzneimittel universell anwendbare Methode der Fingerprintanalyse und der quantitativen Bestimmung entwickelt und an den derzeit am häufigsten in der Therapie eingesetzten Saponindrogen **Semen Hippocastani**, **Radix Primulae** und **Folium Hederæ** erprobt werden.

Hierzu war es notwendig, die bisher bekannte Saponinzusammensetzung der Drogenextrakte zu überprüfen und gegebenenfalls durch Isolierung und Strukturaufklärung weitere Verbindungen zu ergänzen.

Die Arbeit ist als Grundlagenarbeit für die Standardisierung saponinhaltiger Präparate und die spätere Aufnahme dieser Verfahren in die Arzneibücher gedacht.

I. ALLGEMEINER TEIL

1. STRUKTURELLE EINORDNUNG DER BEHANDELTEN SAPONINE

Die Saponine der im folgenden analytisch bearbeiteten Drogen gehören zur Gruppe der Triterpensaponine.

Die Aglykone der Triterpensaponine lassen sich drei Grundtypen zuordnen: den pentacyclischen Triterpenen Oleanan (bzw. Δ^{12} -Oleanen) und Ursan sowie dem tetracyclischen Dammaran. Die Ringe A/B, B/C und C/D besitzen meist trans-, die Ringe D/E cis-Verknüpfung. Allen Sapogeninen gemeinsam ist eine Hydroxygruppe am C-3. Bei monodesmosidischen Triterpensaponinen ist die Zuckerkette an die 3-OH-Gruppe gebunden. Als zweite Bindungsstelle bei den bisdesmosidischen Triterpensaponinen kommt fast ausschließlich C-28 in Form einer Carboxylgruppe in Frage. Als Ausnahme müssen die monodesmosidischen Acylglykosen betrachtet werden, die nur eine Zuckerkette an C-28 tragen.

Alle von uns untersuchten Saponine besitzen ein Aglykon des Oleanan-Typs.

Anhand des Zuckeranteils unterscheidet man Monodesmoside (eine Zuckerkette) und Bisdesmoside (zwei voneinander unabhängige Zuckerketten). In den Saponinen wurden bisher fast ausschließlich die ubiquitär vorkommenden Zucker D-Glucose, D-Galaktose, L-Rhamnose, D-Xylose, D-Arabinose, D-Fucose, D-Chinovose und D-Glucuronsäure nachgewiesen. In den bisher aufgeklärten Saponinen wurden bis zu elf Monosaccharideinheiten gefunden. Zucker der D-Reihe liegen in der Regel in β -glykosidischer, Zucker der L-Reihe in α -glykosidischer Verknüpfung vor. Einige Saponine enthalten zusätzlich als Ester gebundene Carbonsäuren (z.B. Essigsäure, Angelikasäure, Tiglinsäure oder p-Methoxyzimtsäure).

Für die Polarität und das chromatographische Verhalten

eines Saponins ist die Zahl und Art der gebundenen Zucker sowie die Zahl der polaren Gruppen (OH- und COOH-Gruppen) am Aglykon bestimmend.

Einen Überblick über die Struktur und Chemie der Saponine gibt die Literatur (1 - 7).

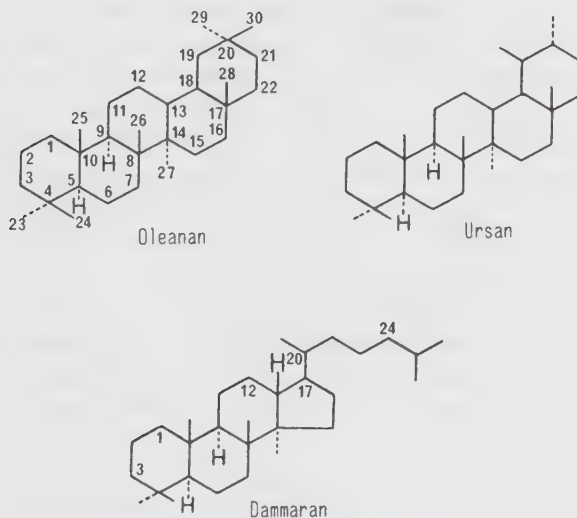


Abb.1: Grundtypen der Triterpensapogenine

2. BIOLOGISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN

Die Fähigkeit, Hämolyse hervorzurufen, ist als eine charakteristische Saponineigenschaft anzusehen. Ihr Mechanismus ist nicht geklärt, es bestehen jedoch Anhaltspunkte, daß diese Wirkung auf dem Herauslösen von Cholesterin oder Albumin aus der Erythrozytenmembran beruht (1). Andererseits konnte gezeigt werden, daß von Cholesterin befreite, intakte Erythrozyten ebenfalls noch hämolysierbar sind. Hierzu sind jedoch meist höhere Saponinkonzentrationen erforderlich.

trationen erforderlich (147). Die hämolytische Aktivität eines Saponins hängt in erster Linie von der Struktur des Aglykons ab. Der Zuckeranteil besitzt modifizierenden Einfluß (9). Hämolytisch stark wirksame Aglykone zeichnen sich durch eine polare Gruppe in Ring A und durch mittlere Polarität in Ring D und E aus. Eine 16 α -OH-Gruppe wirkt verstärkend, stark polare Gruppen in Ring E (z.B. Zuckerkette bei Bisdesmosiden) abschwächend (10, 11). Die für Saponine gefundene Wirksamkeit als Fraßhemmer gegen Insekten (1, 15) und gegen Termiten (14) legt im Zusammenhang mit der antimikrobiellen Wirksamkeit und der ubiquitären Verbreitung im Pflanzenreich (3, 8) den Schluß nahe, daß die Saponine für die Pflanze als Abwehr- bzw. Schutzstoffe gegen Schädlingsbefall aller Art dienen.

Saponine bzw. Saponindrogen wurden wegen ihrer molluskoziden Wirkung von verschiedener Seite zur Bekämpfung des Zwischenwirts der Bilharzioseerreger (Wasserschnecken, besonders *Biomphalaria glabrata*) vorgeschlagen (16, 17, 20, 144).

Die Giftwirkung gegenüber Säugetieren ist bei peroraler Aufnahme meist gering. Das ist von Bedeutung, da viele der menschlichen Ernährung dienende Nutzpflanzen (Soja, Erdnuß, Hafer) Saponine enthalten (15, 21, 22).

Parenteral appliziert besitzen viele Saponine erhebliche Toxizität (1).

Biologisch und pharmakologisch interessante Eigenschaften einiger wichtiger saponinhaltiger Pflanzen geben Tab.1 und 2 an.

Tab.1: Biologische Eigenschaften von Saponinen

antimikrobiell und cytostatisch	(11, 12)
antiviral	(13)
spermizid	(148)
Toxizität gegen Insekten, Termiten	(1, 15, 14)
Schnecken	(16, 17)
Würmer	(18)
Fische	(19)

Tab.2: Pharmakologische Wirkungen von Saponinpflanzen
nach HILLER (6), SHIBATA (23) und HAGER (24)

Glycyrrhiza glabra	expektorierend, antitussiv Süßwirkung kortikoidähnliche Wirkung antiinflammatorisch gegen Magengeschwüre
Bupleurum falcatum L.	Leberschutzwirkung antiinflammatorisch antipyretisch
Polygala senega L.	expektorierend, antitussiv
Panax ginseng C.A.Meyer	
P. quinquefolius L.	
Ginsenosid Rg1	ZNS-Stimulation
Rb1	sedierende Wirkung
	Stimulierung der RNA-Synthese und Cholesterinbiosynthese
Rc	Verminderung der RNA-Synthese
Rb1, Rc	Stimulierung der Serumprotein- biosynthese
Saponinkomplex	Steigerung des ACTH- und Cortico- steronspiegels
Platycodon grandiflorum A. DC.	antiinflammatorisch analgetisch, antipyretisch antitussiv, sedativ
Ruscus aculeatus L.	antiinflammatorisch gegen venöse Stauungen gefäßverengende Wirkung
Quillaja saponaria L.	Hilfsstoff zur Verstärkung der Im- munantwort nach s.c. Injektion von Antigen u. Saponin (145, 146)
Aesculus hippocastanum L., Hedera helix L., Primula veris/elatior	siehe spezieller Teil

3. BISHERIGER STAND DER ANALYTIK

Da die Saponine in der Pflanze meist als komplexe Gemische vorliegen und eine Trennung der Einzelkomponenten vor noch nicht allzu langer Zeit nicht möglich war, handelte es sich bei den ersten Analysenmethoden um Wertbestimmungsmethoden. Man nützte die charakteristischen physikalischen oder biologischen Eigenschaften der Saponine aus. Während bei der Wertbestimmung durch Ermittlung des Schaumindex (25) die Oberflächenaktivität herangezogen wurde, nutzte man bei der Bestimmung des hämolytischen Index (26) die Fähigkeit vieler Saponine, Hämolyse hervorzurufen. Beide Verfahren fanden Aufnahme in die Arzneibücher, wo sie auch heute noch die Standardmethoden darstellen. Beiden Methoden haften prinzipielle Mängel an: Das Schaumbildungsvermögen eines Saponins hängt außer von der Struktur von dessen Wasserlöslichkeit, dem pH-Wert der Lösung und der Temperatur ab. Die hämolytische Aktivität ist ebenfalls stark strukturabhängig, wie z.B. die großen Unterschiede zwischen Mono- und Bidesmosiden zeigen. Beide Methoden sind mit der pharmakologischen Aktivität nicht korrelierbar. Eine weitere biologische Bestimmungsmethode bezieht sich auf die toxische Wirkung von Saponinen auf Tubifex-Würmer (27).

Einen bedeutsamen Fortschritt besonders für die qualitative Analytik von Saponindrogen stellte die Einführung der Dünnschichtchromatographie dar.

Neuere Methoden beruhen auf der Photometrie der Saponine nach Umsetzung zu farbigen Verbindungen mit und ohne vorausgegangener DC-Trennung. Diese kolorimetrischen Verfahren wurden meist für einzelne Saponindrogen entwickelt, und sind nicht universell anwendbar. Die zugrundeliegenden Reaktionen (z.B. mit konzentrierter H_2SO_4) verlaufen nicht stöchiometrisch und führen zur Bildung chemisch nicht definierter Reaktionsgemische. Sie sind sehr unspezifisch und daher fehleranfällig.

Einen Überblick über die Vielzahl der verwendeten Reagenzien gibt die zusammenfassende Literatur (5, 6). In einigen Fällen wurden Saponine in Drogen auch nach DC-Trennung durch densitometrische oder fluorimetrische Direktauswertung bestimmt. Entsprechende Arbeiten liegen über die quantitative Bestimmung der Saponine aus Ginseng radix (28), Hippocastani semen (29, 30, 31), Primulae radix (31), Liquiritiae radix (31) und Hederae folium (31) vor.

Die Methode weist aber prinzipielle Nachteile auf: Die Reinsaponine müssen jederzeit in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, da für jede Platte eine eigene Eichgerade erstellt werden muß. Alle Reaktionsbedingungen (besonders bei der Detektion) müssen sehr genau eingehalten werden, um einigermaßen reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Durch Inhomogenitäten der DC-Platten und Auftragungsprobleme kommen weitere Fehlerquellen hinzu.

Die biologischen Wertbestimmungen sowie die Kolorimetrie ohne vorherige chromatographische Trennung erlauben keine Bestimmung der einzelnen Saponine eines Saponingemisches und somit auch keine Korrelation mit ihren jeweiligen pharmakologischen Aktivitäten, die, wie das Beispiel Ginseng (s. Tab.2) eindrucksvoll zeigt, sehr unterschiedlich sein können. Eine Identitätsprüfung, der Nachweis von Verfälschungen oder eine Bestimmung von Mischpräparaten ist ebenfalls nicht möglich.

In neuester Zeit wurde auch die HPLC zur Bestimmung von Saponinen herangezogen. Neben der direkten Bestimmung der genuinen Saponine sind auch Methoden beschrieben, bei denen die Aglykone nach Hydrolyse der Saponine erfaßt werden. Über die bisher erschienenen Arbeiten über die qualitative und quantitative Bestimmung mittels HPLC gibt Tab.3 Auskunft.

Die HPLC-Trennung von Triterpen- und Steroidsapogeninen (47, 48, 49) wurde sowohl mit Reversed-Phase-Chromatographie auf C₁₈-Material als auch auf Kieselgel durchge-

Tab.3: HPLC-Methoden zur Analyse von Saponindrogen

Droge/Pflanze	bestimmte Verbindungen	Detektion	station. Phase	Lit.
Panax ginseng	Ginsenoside Rb1, b2, c, d, e, g1 Rg2, g1, f, e Rb1, b2, c, d, e, f, g1, g2	UV 240 nm als Benzoate UV 207 nm UV 203 nm	Kieselgel Kieselgel RP 18	32 33 34, 35
Bupleurum falcatum	Saikosaponine a, b1, b2, d a, b1 b1, b2	UV 210 nm UV 210 nm UV 254 nm	RP 18 RP 18 RP 18	36 37 38
Glycyrrhiza glabra	Glycyrrhizin Glycyrrhetinsäure Glycyrrhizin	UV 248 nm UV 248 nm UV 248 nm	RP 18 RP 18 Anionenaust.	39 40 41
Dioscorea sp.	Diosgenin	Refraktometer	Kieselgel	42
Agave sp.	Hecogenin, Dehydrohecogenin, Tigogenin	UV 235 nm als Benzoate	RP 8	43
Glycine max	Sojasapogenine A, B, B1, C, E Sojasapogenine I, II, A1, A2	Massendetektor Fluoreszenz-Derivatis.	Kieselgel RP 18	44 45
Phytolacca dodecandra	12 Saponine (qualitativ)	UV 206 nm	RP 8, DIOL	46

führt. Die Detektion erfolgt mit UV-Detektor oder Refraktometer. Eine HPLC-Bestimmung von Ruscogenin und Neoruscogenin in Drogen und Fertigarzneimitteln wurde von BERTANI und FORNI vorgestellt (50).

Derartige Bestimmungen von Saponingehalten über die Aglykone nach vorausgegangener saurer Hydrolyse der Saponine sind allgemein kritisch zu beurteilen, da bei der Hydrolyse häufig Artefakte entstehen (1). Eine genaue Charakterisierung der entstehenden Aglykongemische ist in der Regel unverzichtbar. Oft kann das genuine Aglykon durch Säurehydrolyse überhaupt nicht gewonnen werden (siehe *Primulae radix*). Bei der Vorsäulenderivatisierung von Saponinen und durch Benzoylierung ist mit Problemen bei der vollständigen Veresterung der zahlreichen OH-Gruppen (bis zu 10 und mehr) zu rechnen.

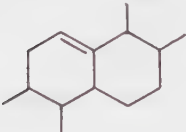
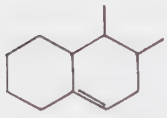
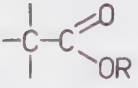
4. ALLGEMEINE ANMERKUNGEN ZUR HPLC-ANALYSE VON SAPONINEN

Die Saponine sind als Glykoside von lipophilen Triterpen- bzw. Steroidaglykonen als Verbindungen mittlerer Polarität zu betrachten. Sie sind allgemein in Alkoholen (Methanol, Ethanol) bzw. Alkohol/Wasser-Gemischen gut löslich. Als Methode der Wahl ist daher die Reversed-Phase-Chromatographie anzusehen. Als stationäre Phasen stehen mit Octadecyl-, Octyl- oder Ethylgruppen modifizierte Kieselgele zur Verfügung. Von den drei in der RP-HPLC im Gemisch mit Wasser verwendeten Elutionsmitteln Methanol, Acetonitril und Tetrahydrofuran ist letzteres für Saponintrennungen mit UV-Detektion wegen seiner relativ hohen Eigenabsorption bis 230 nm meist ungeeignet.

Die Detektion der Saponine stellt mit den heute verbreiteten Detektoren ein Problem dar. Das Refraktometer hat neben seiner geringen Empfindlichkeit den Nachteil, daß die Gradientenelution nur mit hohem technischem Aufwand durchführbar ist. Da die Saponine mit wenigen Ausnahmen

keine bei über 200 - 205 nm absorbierenden Chromophore enthalten, bewegt man sich bei der von uns angestrebten Bestimmung ohne UV-Derivatisierung an der Grenze des photometrisch erfaßbaren Bereiches (190 - 205 nm). Bei Messungen in diesem Bereich weisen die Saponine zwar auch ausreichende Absorption auf, doch werden hierbei hohe Anforderungen an die Probenvorbereitung, die UV-Durchlässigkeit der Elutionsmittel und an die Qualität des Detektors gestellt. In Tabelle 4 sind einige in Saponinen häufig vorkommende Chromophore mit den jeweiligen Maxima und Übergängen aufgeführt (51).

Tab.4: UV-absorbierende Strukturelemente in Saponinen

Strukturelement	Saponin	$\lambda_{\max}$	Übergang
	Alle Δ^{12} -Oleanenderivate	$\sim 195 \text{ nm}$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	Steroidsaponine	$\sim 197 \text{ nm}$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	saure Saponine	200-210 nm	$n \rightarrow \sigma^*$
$R-O-R$	Zuckeranteil	$\sim 190 \text{ nm}$	$n \rightarrow \sigma^*$

Das UV-Spektrum eines Saponins setzt sich additiv aus den Absorptionen der erwähnten Chromophore zusammen, vorausgesetzt, diese stehen untereinander nicht in Wechselwirkung. Maßgeblichen Einfluß übt die alkylsubstituierte exocyclische Doppelbindung aus. Fehlt sie (z.B. bei Olea-

nanderivaten), verschlechtert sich die Empfindlichkeit der Detektion erheblich. Günstiger liegen die Verhältnisse bei den Estersaponinen, da oft im längerwelligen UV-Bereich absorbierende Säurekomponenten wie Tiglin- oder Angelicasäure (Aescin), 4-Methoxyzimtsäure, 3,4-Dimethoxyzimtsäure (Senegae radix) oder N-Methylantranilsäure (Avena sativa) auftreten (1), die eine problemlose Detektion ermöglichen.

Die HPLC stellt für die Analytik polarer Verbindungen (Glykoside) in pflanzlichem Material die Methode der Wahl dar. Sie bietet die Möglichkeit der Identitätsprüfung (Fingerprintanalyse), Standardisierung und Routinekontrolle von Saponindrogen und Fertigarzneimitteln und erlaubt im Gegensatz zur biologischen Wertbestimmung die Korrelation des Saponingehaltes mit der pharmakologischen Wirkung. Durch Kopplung der HPLC-Trennung mit UV-, MS- und DC-Methoden können auch unbekannte Saponingemische strukturell analysiert werden. Die Methode ist auf diese Weise universell einsetzbar.

II. SPEZIELLER TEIL

1. HIPPOCASTANI SEMEN UND AESCIN

1.1 Botanische Einordnung und Bedeutung

Aesculus hippocastanum L. gehört zur Familie der Hippocastanaceae, die insgesamt nur 18 Arten umfaßt und den Sapindaceae und Aceraceae nahesteht. Sie unterteilt sich in die zwei Gattungen *Aesculus* L. und *Billia* PEYRITSCH. Die Gattung *Aesculus* untergliedert sich in 16 Arten. Die Pflanze ist ursprünglich im persischen Raum heimisch, wurde aber im 16. Jahrhundert über Konstantinopel nach Europa eingeführt, wo sie sich durch die Kultur in Garten- und Parkanlagen weit verbreitete. Sie ist heute von Nordgriechenland über Bulgarien bis zu den Britischen Inseln und Skandinavien anzutreffen (52).

Die große Zahl von Arzneibüchern (DAB 8, DAB 7 DDR, Belg.IV, Brasil.2, CF 65, Chil.41, Portug.35, HAB 34, HPUS 64), in die die Droge aufgenommen wurde, zeigt, daß Hippocastani semen unter den Saponindrogen besondere pharmakologische Bedeutung besitzt.

1.2 Inhaltsstoffe des Roßkastaniensamens

1.2.1 Chemie der *Aesculus*-Saponine

Die ersten strukturellen Untersuchungen des als Rohsaponingemisch schon lange bekannten "Aescins" bezogen sich auf die Aglykone. CAINELLI (53) erhielt aus dem Saponin ein Aglykon (*Aescigenin*), für das er die Struktur eines 22 β ,24,28-Trihydroxy-16 α ,21 α -epoxy- β -amyrins ermittelte. KUHN und LÖW (54) erkannten diese Verbindung als Artefakt. Nach NMR-Untersuchungen legten sie die Struktur als

16 α ,21 β ,22 α ,24,28-Pentahydroxy- β -amyrin fest und nannten die Verbindung Protoaescigenin (56). TSCHESCHE und WULFF (55) fanden später im Hydrolysat von "Aescin" noch das 24-Desoxyderivat des Protoaescigenins (Barringtogenol C).

YOSIOKA (57) erhielt durch Hydrolyse von "Aescin" durch Bodenbakterien in geringer Menge ein weiteres Aglykon, das er als 16-Desoxy-barringtogenol C identifizierte. Diese Verbindung wurde in späteren Arbeiten jedoch nicht wiedergefunden.

Als Monosaccharideinheiten wurden im Aescin Glucose, Galaktose, Xylose und Glucuronsäure gefunden (58, 59). Als Bindungsstelle der Zuckerkette wurde allein die 3 β -OH-Gruppe festgelegt. Eine aglykonständige β -D-Glucuronsäure trägt in 2- und 4-Stellung je einen weiteren Zucker in β -glykosidischer Verknüpfung (58, 60) und zwar nur in den Kombinationen Glucose/Glucose, Glucose/Xylose oder Glucose/Galaktose (61).

"Aescin" enthält die als Ester gebundenen aliphatischen Carbonsäuren Tiglinsäure, Angelicasäure, α -Methylbuttersäure, i-Buttersäure und Essigsäure (54).

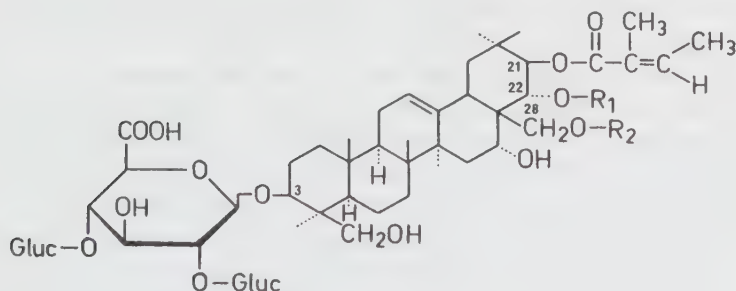


Abb.2: Hauptsaponin des Roßkastaniensamens

Später fand man unter Einsatz verbesserter Trenntechniken, daß sich das Saponingemisch des Roßkastaniensamens in drei Fraktionen auftrennen läßt. Durch Kristallisation wurde das schwer wasserlösliche, hämolytisch aktive β -Aescin gewonnen. Nach dem Auskristallisieren des β -Aescins wurde aus der Mutterlauge das wasserlösliche α -Aescin und das hämolytisch inaktive Kryptoaescin durch Gegenstromverteilung isoliert (59, 62, 63). Bei den verschiedenen Saponinfraktionen wurden für die Säuren unterschiedliche Bindungsstellen ermittelt. Im kristallinen β -Aescin befinden sich am 21β -OH Tiglin- oder Angelicasäure, am 22α -OH Essigsäure (bzw. in geringer Menge α -Methylbutter- oder i-Buttersäure) (60, 63). Im Kryptoaescin hingegen ist die Essigsäure an 28 -OH gebunden. Beim α -Aescin treten sowohl 22 - als auch 28 -O-Acetylverbindungen auf. Es ist somit als Gemisch aus β -Aescin und Kryptoaescin zu betrachten (63, 64).

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß β -Aescin unter Isomerisierungsbedingungen (pH 6.5, 60°C , wäßrige Lösung) unter $22 \rightarrow 28$ -Acetylwanderung bis zu einer Gleichgewichtseinstellung in Kryptoaescin übergeht, wobei sich die hämolytische Aktivität halbiert (63, 64). Dieses im Gesamtsaponin vorliegende Isomergemisch ist als das früher beschriebene α -Aescin zu betrachten (65).

Über die quantitative Zusammensetzung des β -Aescins machen WULFF und TSCHESCHE (60) sowie WAGNER, SCHLEMMER und HOFFMANN (64) Angaben. Demnach stellen Saponine mit Protoaescigenin als Aglykon, einem Mol Glucuronsäure und zwei Mol Glucose sowie Angelica-/Tiglinsäure an 21β -OH und Essigsäure an 22α -OH mit etwa 40% den Hauptanteil im β -Aescin dar. Xylosehaltige Saponine mit den gleichen Säurekomponenten sind mit etwa 15%, galaktosehaltige mit zwischen 2 und 12% vertreten. Der Rest entfällt auf Barringtogenol-C-Glykoside und Verbindungen mit i-Buttersäure und α -Methoxybuttersäure im Esteranteil. Das Verhältnis der Aglykone Protoaescigenin und Barringtogenol C

wird mit 8 : 2 angegeben. WULFF und TSCHESCHE (60) kommen zu dem Schluß, daß sich β -Aescin aus über 30 Einzelverbindungen zusammensetzt. Berücksichtigt man die beschriebene 22→28-Acetylwanderung, so kann sich das Gesamtsaponingemisch aus über 60 äußerst ähnlichen Verbindungen zusammensetzen.

1.2.2. Weitere bekannte Inhaltsstoffe

Tabelle 5 gibt einen Überblick über weitere Inhaltsstoffe des Roßkastaniensamens.

Tab.5 Inhaltsstoffe des Roßkastaniensamens

Stoffgruppe	Verbindung	Lit.
Flavonoide	Quercetin-u.Kämpferol-3-O-glykoside mit 1-3 Zuckern (Glu, Xyl, Rha) Quercetin-u.Kämpferol-3,3'-O-glykoside mit 2-3 Zuckern (Glu, Xyl)	66
Leucoanthocyane	Leucocyanidin Leucodelphinidin	67
Catechine	D-Catechin, Catechingerbstoffe	68
Aminopurine	Adenin, Adenosin, Guanin, Harnsäure	68
Sonstige	Phytosterine, Methionin, Cholin Vitamin C, B-Vitamine	68

1.3 Pharmakologische Eigenschaften von Aescin und Roßkastanienextrakten

Aescin und Roßkastanienextrakte besitzen zwei therapeutisch genutzte Wirkungskomponenten. Die **antiödematöse und kapillarfragilitätsmindernde Wirkung** bei entzündlichen Prozessen beruht wahrscheinlich auf der Beeinflussung der Hypophysen-Nebennierenachse. Versuche an adrenektomierten und hypophysektomierten Ratten ergaben, daß für diese Wirkungen die intakte Hypophyse und Nebennierenrinde erforderlich ist (70, 71, 77). Die **venotonisierende Wirkung** ist eventuell mit einer Steigerung der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion erklärbar, die durch nichtsteroidale, anti-inflammatorische Verbindungen gehemmt wird (81, 82). Bei Tests der verschiedenen Aescinfraktionen am Ovalbumin- und Verbrennungsödem von Ratten zeigte sich, daß die Wirksamkeit parallel zur Toxizität in der Reihenfolge Kryptoaescin - α -Aescin - β -Aescin zunimmt. Daneben wirkten sich Aescingaben positiv auf Stauungsödeme aus (73).

β -Aescin wird in Form der amorphen Säure und auch als Natriumsalz nach peroraler Gabe gut resorbiert und übt somit auch nach oraler Applikation eine ödemhemmende Wirkung aus (75, 78).

Neben den in Tabelle 6 aufgeführten Wirkungen besitzen Roßkastaniensaponine auch noch eine fungistatische (getestet an Dermatophyten, 84), anthelmintische (18), schwach antibakterielle (12) und stark fraßhemmende Wirkung auf Termiten (14). Hervorzuheben ist ihre stark antivirale Aktivität gegenüber Influenzaviren (13).

Tab.6: Pharmakologische Eigenschaften von Aescin bzw. Roßkastanienextrakten

- Erhöhung der Kapillarresistenz und Hemmung der Exsudation (experimentelles Rattenpfotenödem)	69, 70
- Steigerung der Glucocorticoidfreisetzung (nur bei intakter Nebennierenrinde und Hypophyse)	71
- positive Beeinflussung des experimentellen Hirnödems	72
- positive Wirkung auf Stauungsödeme	73
- Erhöhung der Corticosteroidsynthese und -ausschüttung durch Stimulierung der ACTH-Sekretion	76
- Steigerung der Plasma-Glucose-Konzentration	77
- Therapie chronischer Venenleiden	79
- venenkontrahierende Wirkung an isolierten Venen von Mensch und Tier	74, 80
- Steigerung der Prostaglandinbiosynthese und -freisetzung (PGF2 α) durch in isolierte Rattenlungen perfundiertes Aescin	81, 82
- Antagonismus zu einer durch PGE1 induzierten, gesteigerten Durchlässigkeit der Plasma-Lymph-Schranke	83

1.4 Bisherige Bestimmungsmethoden

Die klassische **Wertbestimmung** über den hämolytischen Index, wie sie in den Arzneibüchern vorgeschrieben ist, wurde von SZILAGYI (85) durch Anwendung der Agardiffusionsmethode verbessert. Dabei werden die alkoholischen Testlösungen auf Blutagarplatten gebracht und der Durchmesser der entstehenden Hämolysezonen gemessen. Aus Verdünnungsreihen werden Kalibrierungskurven erstellt. Der mittlere Fehler betrug etwa 5%.

SCHLEMMER und KERN (86) stellten eine automatisierte Bestimmung des hämolytischen Index vor, die auf der Erstellung einer Verdünnungsreihe und der Messung der

Lichtdurchlässigkeit beruht. Allgemeine Nachteile der hämolytischen Wertbestimmung liegen darin, daß die erhaltenen Werte von verschiedenen Bestimmungsmethoden nicht ohne weiteres vergleichbar sind, da unterschiedliche "Blutqualitäten" zu veränderten Hämolytischen Indices führen.

Die am häufigsten verwendete Methode zur Bestimmung des **Saponingehalts** in Roßkastanienextrakten wurde von SCHLEMMER (87, 88) entwickelt. Sie beruht auf der Umsetzung der nach Ausschütteln erhaltenen Saponinfraktion mit Eisen(III)-chlorid-Essigsäure-Schwefelsäure-Reagenz und anschließender Bestimmung bei 540 nm. Es wird jeweils ein Aescinstandard mitbestimmt. Durch die Reaktion werden alle ausschüttelbaren Saponine, auch teilweise oder ganz deacylierte und partiell hydrolysierte, erfaßt. Die Methode erfordert hohen Zeitaufwand und genauestes Einhalten der vorgeschriebenen Bedingungen um, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Diese Methode fand in leicht modifizierter Form Aufnahme in das DAB 8 (89). Nachteilig für die Erzielung richtiger Werte wirkt sich bei der Arzneibuchmethode aus, daß kein Aescinstandard mitbestimmt wird. Die Saponingehalte werden direkt über eine festgelegte spezifische Extinktion berechnet. Durch Automatisierung der Methode konnte der Zeitaufwand erheblich verringert und relative Standardabweichungen von 2-4% erreicht werden (91).

WINKLER (90) fand bei der DC-Trennung von Roßkastanienextrakten neben einer hämolysierenden, dem β -Aescin zuzuordnenden Zone noch zwei andere nicht hämolysierende Zonen. Er bestimmte durch Auskratzen von der Platte und Umsetzung mit dem Eisen(III)-Reagenz nur die β -Aescin-Zone und erhielt so in Extrakten um 50-60% zu niedrige Werte. Aus heutiger Sicht stammen die nicht hämolysierenden Zonen von Kryptoaescin.

Neben diesen speziell für Hippocastani semen ausgearbeiteten Bestimmungsmethoden gibt es eine Reihe von Arbeiten

über die Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen von Drogenextrakten, bei denen unter anderem auch Aescin bestimmt wurde. Die Methoden unterscheiden sich vor allem in der Wahl der Detektionsmittel. HAMMERSTEIN und KAISER (29) bestimmen fluorometrisch nach Detektion mit Zinkchlorid-Reagenz. FRANK (30) detektiert über die Entfärbung des Farbstoffes Nilblau durch die Saponine. Eine Remissionsmessung nach Besprühen mit konzentrierter Schwefelsäure wird von GLASL und IHRIG (31) vorgeschlagen. Nach VANHAELEN (92) wird Aescin mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz detektiert und bei 530 nm durch Absorptionsmessung erfaßt.

Eine Aescinbestimmung durch Radioimmunoassay, wobei das Aescin über die Carboxylgruppe der Glucuronsäure an Rinderserumalbumin gekoppelt wird, beschreiben LEHTOLA und Mitarb. (93).

1.5 HPLC-Analyse von β -Aescin

1.5.1 Trennung von Aescin in verschiedenen Trennsystemen

1.5.1.1 Trennung auf C₁₈-Umkehrphasen (RP 18)

Auf dieser stationären Phase erwiesen sich Acetonitril- und Methanol-Wasser-Gemische mit Zusatz von Phosphorsäure als geeignet. Der Säurezusatz verbesserte die Trennung erheblich. Die UV-Durchlässigkeit des Elutionsmittels im Bereich von 190 - 210 nm wurde im Gegensatz zur häufig verwendeten Essigsäure praktisch nicht erniedrigt. Säurezusätze verringern das Tailing sowohl bei den zu bestimmenden (sauren) Substanzen wie auch bei den sehr häufig als Begleitstoffe auftretenden phenolischen Verbindungen oder Pflanzensäuren. Zahlreiche Saponine haben sauren Charakter bedingt durch eine Uronsäure im Zuckeranteil (z.B. Aescin) oder durch freie Carboxylgruppen im Aglykon.

Abb.3 zeigt die Trennung von β -Aescin (Madaus) mit 35% Acetonitril unter Säurezusatz in isokratischer Arbeitsweise (TS 1). Die ebenfalls abgebildeten UV-Spektren wurden mit Hilfe eines Photodiodenarray-Detektors (94) on-line aufgenommen. Aus ihnen geht hervor, daß Aescin bei einer Detektionswellenlänge von 210 nm mit der höchsten Empfindlichkeit erfaßt werden kann. Die methanolische Probenlösung enthielt ca. 2 mg β -Aescin/ml. Der mit S gekennzeichnete Peak ist ein zugefügter innerer Standard, der bei den folgenden quantitativen Untersuchungen benötigt wurde.

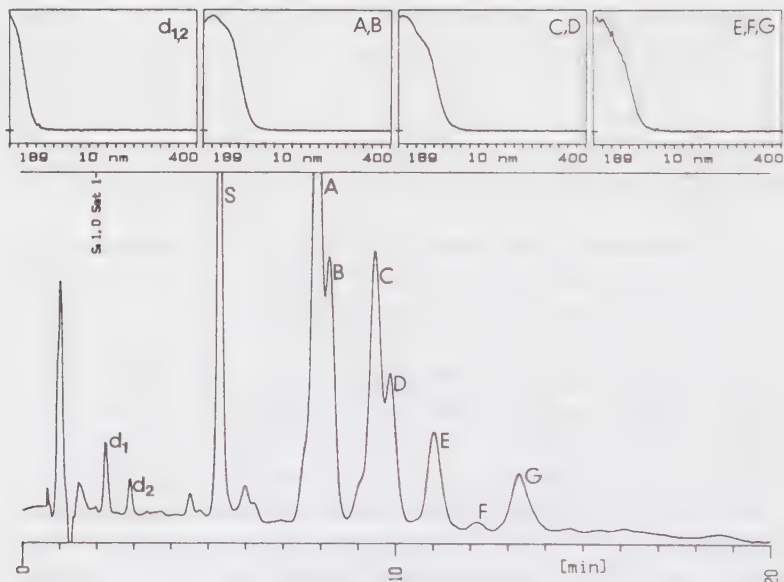


Abb.3: HPLC-Trennung von β -Aescin auf LiChrospher RP 18 mit Acetonitril/Wasser (TS 1) und den entsprechenden UV-Spektren

Kristallines β -Aescin liefert bei der HPLC-Trennung (TS 1) zwei charakteristische Doppelpeaks mit den Retentionszeiten 7.9 / 8.2 (A, B) und 9.4 / 9.8 min (C, D). Die Doppelpeaks A/B und C/D besitzen geringfügig unterschiedliche UV-Spektren, was auf Unterschiede im Acylrest (Angelica- bzw. Tiglinsäure) hinweist. Bei den Peaks E, F und G handelt es sich nach den UV-Spektren ebenfalls um vollständig acylierte Saponine. Die Peaks bei 2.2 und 2.9 min (d_1 und d_2) stammen nach ihrem Retentionsverhalten und den UV-Spektren von Deacylsaponinen. Der Versuch, Aescin auf der gleichen Säule mit Methanol-Wasser-Gemischen (65% Methanol, TS 2) zu trennen, führte zu dem in Abb.4 dargestellten Ergebnis. Es gelang eine gewisse Trennung in vier unvollständig aufgelöste Hauptpeaks. Die UV-Spektren lieferten in diesem Fall keine Information über Unterschiede in den Acylgruppen, da durch die schlechte Peakauflösung nur überlagerte Spektren zu erhalten waren.

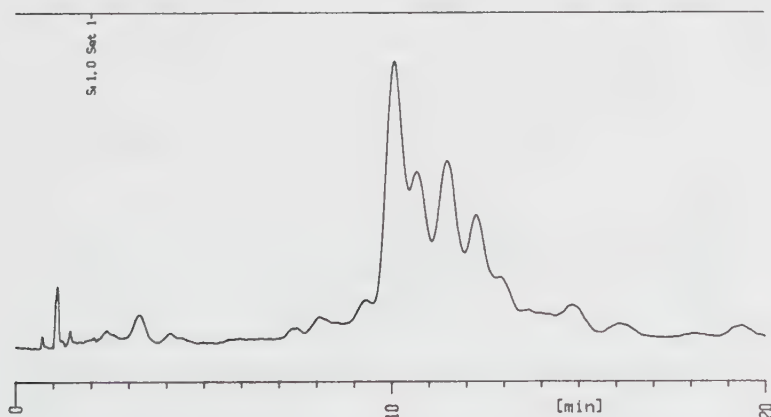


Abb.4: HPLC-Trennung von β -Aescin auf LiChrospher RP 18 mit Methanol/Wasser (TS 2)

1.5.1.2 Trennung auf C_8 - und C_2 -Umkehrphasen (RP 8, RP 2)

Auf einer RP-8- und einer RP-2-Phase wurden mit 35%igem Acetonitril (TS 1) ähnliche Trennungen wie mit RP-18-Material erzielt. Die Retentionszeiten waren etwas kürzer, eine Auflösung der Hauptpeaks in Doppelpeaks konnte jedoch nicht beobachtet werden. Prinzipiell sind daher diese beiden stationären Phasen für Saponintrennungen ebenfalls geeignet.

1.5.1.3 Trennung auf einer DIOL-Phase

Bei dieser Phase handelt es sich um Trennmaterial mit leicht polaren Eigenschaften (DIOL-Phase) (95), das durch Umsetzung der Silanolgruppen des Trägermaterials mit Epoxysilanen und anschließender Hydrolyse hergestellt wird.

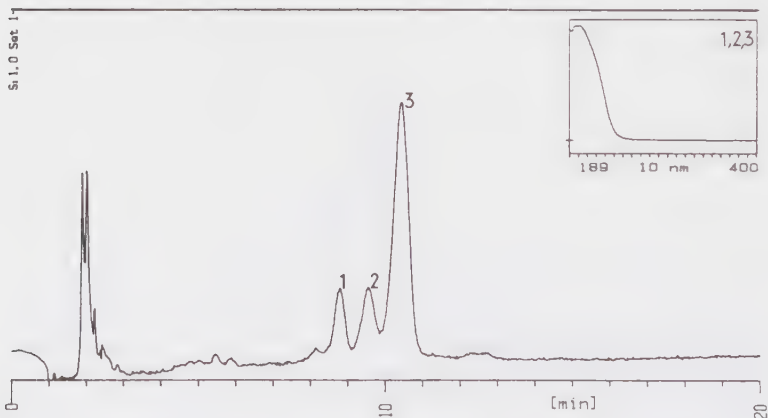


Abb.5: HPLC-Trennung von β -Aescin auf LiChrosorb DIOL (TS 3)

Abb.5 zeigt eine Trennung von Aescin mit 92% Acetonitril unter Zusatz von Phosphorsäure und Verwendung eines Flow-Programmes (TS 3). Es sind drei Hauptpeaks mit identischen UV-Spektren erkennbar.

Vom Trennmechanismus her handelt es sich hierbei nicht mehr um eine echte Reversed-Phase-Chromatographie sondern wegen des relativ apolaren Elutionsmittels eher um Adsorptionschromatographie (Normal-Phase). Gradientenelution verschlechterte die Trennung.

1.5.1.4 Trennversuch auf einer Cyano-Phase

Diese stationäre Phase enthält chemisch gebundene Alkyl-nitril-Gruppen, ist mittelpolar (95) und erlaubt Trennungen sowohl im Reversed-Phase-Modus (mobile Phase ist polarer als stationäre) als auch im Normal-Phase-Modus (mobile Phase ist apolarer als stationäre) (95). Trennversuche mit Aescin ergaben mit 10-20%igem Acetonitril nur einen extrem breiten, völlig undifferenzierten Peak, mit einem Acetonitril/n-Hexan-Gemisch (100:10) keine ausreichende Retention. Typische Normal-Phase-Elutionsgemische wie n-Hexan-Dichlormethan-Isopropanol (95) konnten wegen der Eigenabsorption der halogenierten Kohlenwasserstoffe bei 210 nm nicht verwendet werden.

Nach diesen Ergebnissen erschien uns RP 18-Material als stationäre Phase und Acetonitril-Wasser-Gemische mit Phosphorsäurezusatz als mobile Phase für Saponintrennungen als am besten geeignet.

1.5.1.5 Temperaturabhängigkeit der Saponintrennung

Die Retentionszeit einer Substanz bei der HPLC-Trennung nimmt im Normalfall bei sonst konstant gehaltenen Bedingungen mit Erhöhung der Säulentemperatur ab (96). Um den Einfluß der Temperatur auf die Aescin-Trennung zu

ermitteln, führten wir neun HPLC-Trennungen bei Temperaturen zwischen 0 und 80°C in 10°-Abständen durch. Dabei wurde die Säule durch ein Wasser- oder Eisbad gekühlt bzw. mit einem Säulenofen auf die erforderliche Temperatur gebracht. Die Analysen wurden bei sonst konstanten Bedingungen im Trennsystem 1 (TS 1) ausgeführt. Die Retentionszeiten der Doppelpeaks A/B und C/D wurden in einem Diagramm (Abb.6) gegen die Säulentemperatur aufgetragen.

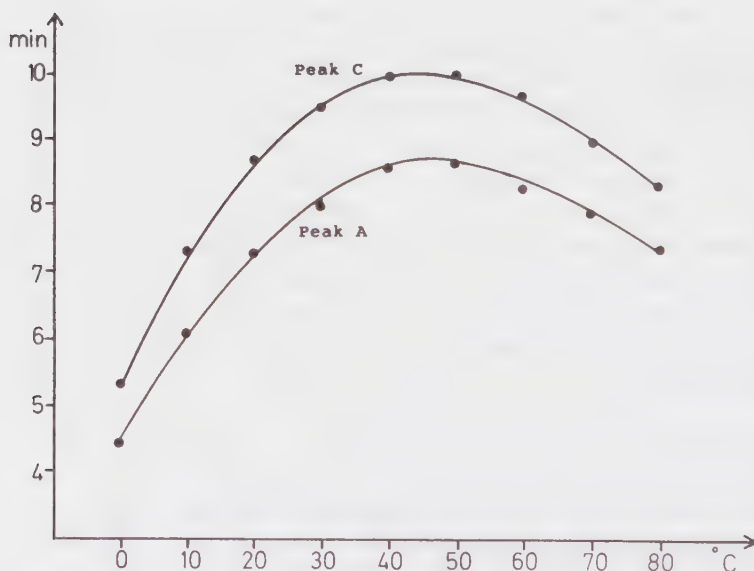


Abb.6: Temperaturabhängigkeit der Retentionszeiten der Saponine (Doppelpeaks A/B und C/D) bei der Aescintrennung (TS 1)

Aescin zeigte ein von der oben beschriebenen Norm völlig abweichendes Verhalten. Bei Erniedrigung der Temperatur kam es zu einer starken Verkürzung der Retentionszeiten, wobei auch der Abstand der Peaks A/B und C/D geringer wurde. Die Retentionszeiten erreichten bei ca. 45°C ein Maximum, bei weiterer Erhöhung der Temperatur nahmen die Retentionszeiten wieder ab.

Daraus folgt, daß eine Temperaturänderung die Selektivität des Trennmaterials für Saponine verändert. Dies eröffnet die Möglichkeit, z.B. Überlagerungen von Saponinpeaks und Nicht-Saponinpeaks durch Temperaturänderung zu umgehen.

Da nach ENGELHARD (96) die Retentionszeit einer Substanz von der Art der funktionellen Gruppen und der Möglichkeit der Annäherung dieser Gruppen an die Oberfläche des Trennmaterials abhängt, könnte dieses ungewöhnliche Verhalten auf unterschiedliche Konformationen der Saponinmoleküle bei verschiedenen Temperaturen zurückzuführen sein. Eine verschieden starke "Abschirmung" des Aglykons durch den Zuckeranteil bei verschiedenen Temperaturen könnte eine Erklärung für das Retentionsverhalten sein, da für die Retention an RP-Material der lipophile Anteil des Saponinmoleküls ausschlaggebend ist. Die zunehmende "Abschirmung" des Aglykons führt dann zu einer Erniedrigung der Retentionszeit.

1.5.2 Strukturelle Zuordnungen der Peaks der Aescin-Trennung

Aufgrund der etwas unterschiedlichen UV-Spektren der Peaks A/B und C/D (Abb.3) war zu vermuten, daß sich die zugehörigen Saponine im Esteranteil unterscheiden. Tiglinsäure ($\lambda_{\text{max}} = 213 \text{ nm}$) besitzt mit $\epsilon = 12500$ eine höhere molare Extinktion als Angelicasäure ($\lambda_{\text{max}} = 216 \text{ nm}$) mit $\epsilon = 9000$ (51). Das heißt, daß Tiglinsäure-haltige

Saponine wegen der additiven Zusammensetzung der UV-Spektren im Bereich von 210–220 nm eine höhere molare Extinktion aufweisen als Angelicasäure-haltige Saponine.

Durch Registrierung des Chromatogrammes bei zwei verschiedenen Wellenlängen (200 und 210 nm) und Ermittlung des Verhältnisses der beiden Signale (Ratiobildung) konnten wir beweisen, daß den Peaks A/B die Tiglinsäure-haltigen und C/D die Angelicasäure-haltigen Saponine zuzuordnen sind (Abb.7).

Ein geringer Ratiowert (200 nm/210 nm) bedeutet, daß eine stärkere Absorption bei 210 nm auftrat. Da der Ratiowert bei Peak A/B geringer ist als bei C/D, ist daraus zu schließen, daß die Peaks A/B Tiglinsäure und die Peaks C/D Angelicasäure enthalten. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen wir bei Peak E und G. Demnach enthält Peak E Tiglin- und Peak G Angelicasäure. Die ansteigenden Ratiowerte an der rechten Flanke von Peak B und D bzw. linken Flanke von E deuten auf Verbindungen mit geringer Absorption bei 210 nm hin, also z.B. auf Saponine ohne α - β -ungesättigte Säure im Esteranteil.

Zwischen den Peaks A und B bzw. C und D bestehen in den UV-Spektren keine Unterschiede; sie weisen äußerst ähnliche Retentionszeiten auf und können sich deshalb nur in der Art der Verknüpfung nicht aber in der Zahl der Zucker unterscheiden. Wie bei anderen Saponinen (siehe *Primulae radix* und *Hederae folium*) festgestellt werden konnte, beeinflußt eine unterschiedliche Zahl von Monosaccharideinheiten bei gleichem Aglykon oder unterschiedliche Anzahlen von OH-Gruppen am Aglykon, wie sie auch bei Protoaescigenin und Barringtonenol C vorliegen, das chromatographische Verhalten eines Saponins viel stärker. Die Peaks A/B und die Schulter links von A sind somit Tiglinsäure-haltigen Saponinen mit den drei beschriebenen Zuckerkombinationen (neben Glucuronsäure) Glucose-Glucose, Glucose-Galaktose und Glucose-Xylose (61) zuzuordnen. Das gleiche gilt für Peak C/D und die Schulter

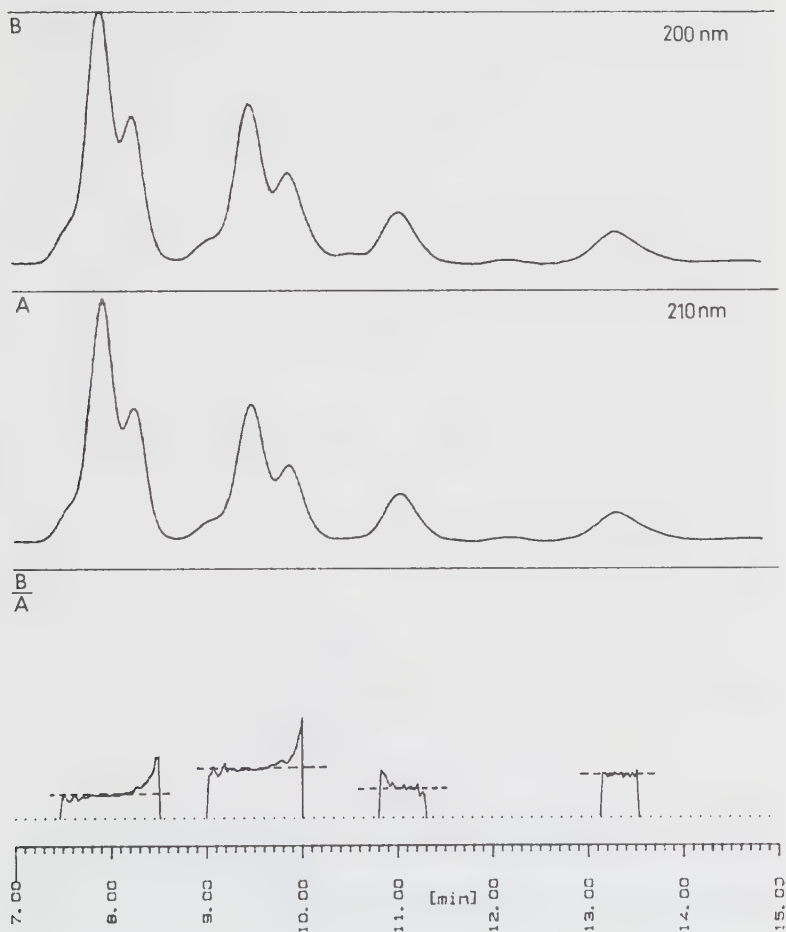


Abb.7: Ratio-Plot der β -Aescin-Trennung (TS 1) bei Detektionswellenlängen von 200 und 210 nm

links von C in Kombination mit Angelicasäure. Bei Peak E und G könnte es sich entweder um zuckerärmere oder um Saponine mit anderem Aglykon handeln. Der erste Fall ist auszuschließen, da solche Verbindungen noch nie in Aescin beschrieben wurden. Sie wären außerdem bei der Methylierungsanalyse leicht nachweisbar gewesen. Da das Verhältnis der Aglykone Protoaescigenin und Barringtogenol C in der Literatur (60) mit etwa 8 : 2 angegeben wird, muß es sich bei den Peaks A/B und C/D um Protoaescigeninglykoside und den Peaks E und G um Barringtogenol-C-Glykoside handeln. Für diesen Schluß sprechen auch die längeren Retentionszeiten von Peak E und G, die mit Barringtogenol C ein um eine OH-Gruppe ärmeres und somit deutlich lipophileres Aglykon besitzen. In Tab.7 ist die von uns getroffene Zuordnung zusammenfassend aufgeführt (vergl. auch Abschnitt 1.8).

Tab.7: Strukturelle Zuordnung der Aescinpeaks (TS 1)

Peak A/B	Protoaescigeninglykoside mit Tiglinsäure im Esteranteil
Peak C/D	Protoaescigeninglykoside mit Angelicasäure im Esteranteil
Peak E	Barringtogenol-C-Glykoside Tiglinsäure im Esteranteil
Peak G	Barringtogenol-C-Glykoside Angelicasäure im Esteranteil

Bei der Aescin-Trennung auf der DIOL-Phase (Abb.5) bestimmt der Zuckeranteil der Saponine aufgrund der höheren Polarität der stationären Phase das Retentionsverhalten. Nach Angaben der Literatur (60, 64) beträgt das Mengenverhältnis zwischen den Saponinen mit Glu/Glu/Glsr,

Glu/Gal/Glsr und Glu/Xyl/Glsr im Zuckeranteil etwa 3.5 : 1 : 1. Dieses Verhältnis zeigt sich auch bei den Peakflächen der Aescin-Trennung auf der DIOL-Phase. Demnach muß der größte Peak (3) ohne Differenzierung nach verschiedenen Aglykonen oder Acylresten den Saponinen mit der Zuckerkombination Glu/Glu/Glsr zugeordnet werden.

1.6 HPLC-Analyse von Roßkastaniensamenextrakten und -zubereitungen

1.6.1 Probenvorbereitung und HPLC-Trennung

Das zur Aescin-Trennung verwendete Trennsystem 1 (TS 1) war auch für die Trennung von Extrakten geeignet (Extraktion und genaue Vorschrift für die Probenvorbereitung siehe exp. Teil). Um eine Überladung und eine Verschmutzung der Trennsäule mit lipophilen, nicht mehr eluierbaren Substanzen zu vermeiden, war eine Vorreinigung der Extrakte erforderlich. Zur Abtrennung von hydrophilen und lipophilen Begleitstoffen bewährte sich die Filtration über RP 18-Material (Sep-Pak-Kartuschen). Dabei wurde der Trockenextrakt in 30%igem Methanol gelöst und durch die Sep-Pak-Kartusche gespritzt. Dann wurden sehr polare Substanzen wie Zucker, Gerbstoffe und teilweise die Flavonoide mit demselben Lösungsmittelgemisch eluiert. Die Saponine sowie andere Substanzen mittlerer Polarität wurden auf dem Packungsmaterial zurückgehalten. Durch Elution mit Methanol gewinnt man die Probelösung. Auf der Kartusche bleiben extrem lipophile Substanzen wie fettes Öl aus den Samen oder Sterine zurück. Dieses Verfahren bewirkt neben der Verbesserung der HPLC-Trennung auch eine Verlängerung der Lebensdauer der HPLC-Säulen. Die Vorreinigungsmethode wurde durch systematische Veränderung der Parameter unter DC-Kontrolle optimiert. Insbesondere wurde überprüft, ob Verluste an Saponinen durch

vorzeitige Elution auftraten. Da eine Kartusche nur begrenzte Kapazität besitzt, muß besonders darauf geachtet werden, die Probenmenge nicht zu groß zu wählen. Bei einer Menge von etwa 40-50 mg Trockenextrakt traten keine Verluste auf.

Abb.8 zeigt die DC-Trennung eines methanolischen Roßkastanienextraktes vor und nach der Sep-Pak-Vorreinigung (DC TS 1).

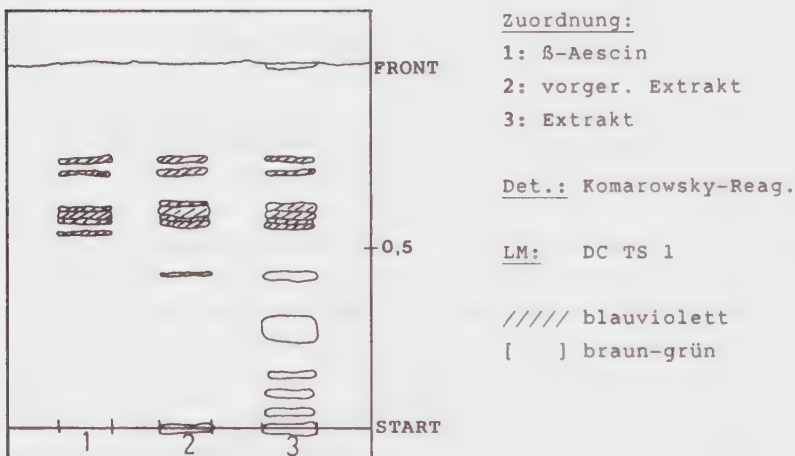


Abb.8: DC-Trennung eines methanolischen Roßkastanienextraktes vor und nach der Vorreinigung

Bei der HPLC-Trennung eines vorgereinigten Roßkastanienextraktes (Abb.9) findet man neben den für Aescin charakteristischen Peaks (A-E) sechs weitere Peaks (a-f, $R_t = 12 - 20$ min). Bei $R_t = 1.5$ min tritt außerdem ein Peak auf, bei dem es sich laut UV-Spektrum um ein Gemisch verschiedener Flavonoide handelt. Der mit S gekennzeichnete Peak entspricht dem inneren Standard, der für die

späteren quantitativen Bestimmungen benötigt wurde (siehe nächstes Kapitel). Die UV-Spektren der Peaks a-f sind identisch und stimmen auch mit denen des β -Aescins überein. Es mußte sich hierbei ebenfalls um Saponine handeln. Die bei β -Aescin auftretenden Peaks F und G konnten im Extrakt nicht wiedergefunden werden. Sie sind offensichtlich durch andere Verbindungen überlagert. Wie beim β -Aescin treten auch im Extrakt deacylierte Saponine ($R_t = 2.2$ und 2.9 min) auf.

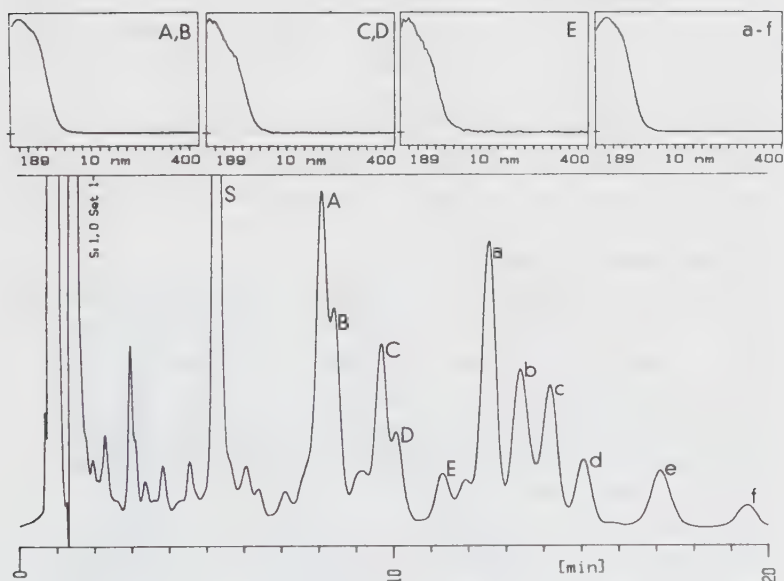


Abb.9: HPLC-Trennung von Roßkastaniensamenextrakt (TS 1) mit den entsprechenden UV-Spektren

1.6.2 Strukturelle Zuordnung der Extraktpeaks

Durch frühere Untersuchungen (62, 63, 64) war bekannt, daß in Extrakten neben dem kristallisierbaren β -Aescin noch andere Saponine enthalten sind. Diese als Kryptoaescin und α -Aescin benannten Fraktionen zeigen sehr ähnliches dünn-schichtchromatographisches Verhalten. Kryptoaescin zeichnet sich durch hämolytische Inaktivität aus, besitzt aber gleiche Elementarzusammensetzung wie β -Aescin (63).

Im Kryptoaescin ist die Essigsäure statt an der 22α -OH- an der 28-OH-Gruppe lokalisiert. Durch Isomerisierung von β -Aescin bei pH 6.5 in wäßriger Lösung erhält man bis zu einer Gleichgewichtseinstellung ein Gemisch aus 22α -O-Acetyl- und 28-O-Acetylverbindungen (64).

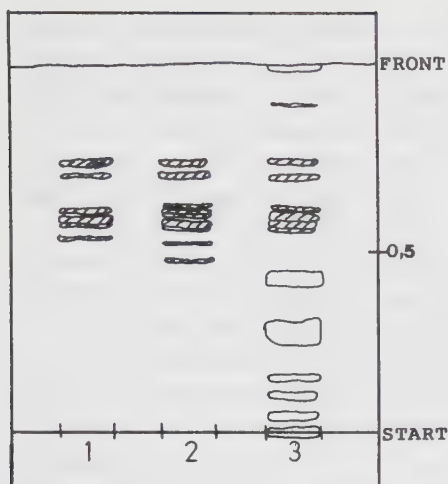
Um zu überprüfen, ob die bei der HPLC-Trennung von Roßkastaniensamenextrakten auftretenden zusätzlichen Peaks den 28-O-Acetylverbindungen zuzuordnen sind, versuchten wir, das β -Aescin unter den in der Literatur beschriebenen Bedingungen umzulagern.

Aescin wurde mit Wasser versetzt und auf pH 6.5 gebracht, wobei es sich glatt löste. Nach bestimmten Reaktionszeiten wurden HPLC- und DC-Trennungen durchgeführt (TS 1 bzw. DC TS 1).

Nach 1½-stündiger Reaktionszeit ergab sich bei der DC-Trennung das in Abb.10 und bei der HPLC-Trennung das in Abb.11 wiedergegebene Bild.

Gegenüber dem β -Aescin ist im Reaktionsgemisch bei der DC-Trennung (Abb.10) zwar eine deutliche Veränderung feststellbar, doch eine genaue Zuordnung ist wegen der Vielzahl sich überlagernder Zonen schlecht möglich.

Sowohl im Extrakt wie auch im Umlagerungsgemisch tritt bei $R_f = 0.4$ eine deutliche Zone auf, die bei β -Aescin nicht nachweisbar ist. Beim Umlagerungsgemisch tritt eine im β -Aescin nicht nachweisbare Zone ($R_f = 0.3$) auf (evt. Deacetylverbindungen).



Zuordnung:

1: β -Aescin

2: " nach
Umlagerung

3: Extrakt

Det.: Komarowsky-Reag.

LM: DC TS 1

////// blauviolett

[] braun-grün

Abb.10: DC-Trennung des Umlagerungsproduktes von β -Aescin

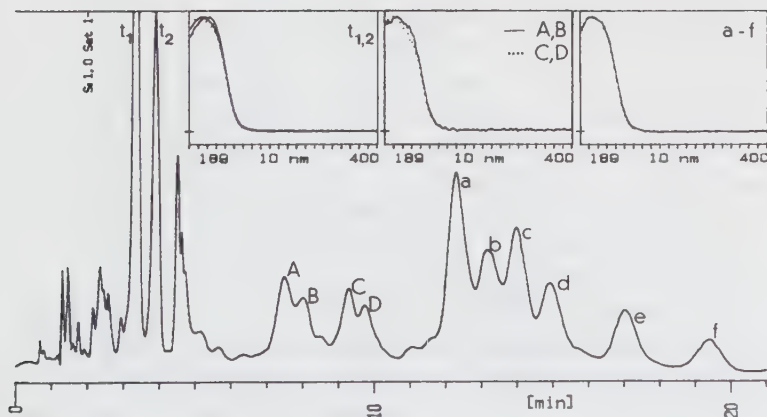


Abb.11: HPLC-Trennung des Umlagerungsproduktes von
 β -Aescin (TS 1)

Die beiden in β -Aescin dominierenden Doppelpeaks A/B und C/D haben deutlich abgenommen, dafür kommen neue Peaks a-f hinzu, die auch im Extrakt (Abb.9) nachweisbar sind. Sie stimmen sowohl in den Retentionszeiten wie auch in den UV-Spektren überein. Ihre quantitative Verteilung im Extrakt und im Reaktionsgemisch weist ebenfalls Ähnlichkeit auf.

Bei den ebenfalls neu auftretenden Peaks bei 3.4 und 3.9 min handelt es sich um deacetylierte Verbindungen. An den UV-Spektren ist noch eindeutig das Vorhandensein der Tiglin-/Angelicasäure im Esteranteil der Saponine zu erkennen. Bei vollständiger Deacylierung hingegen wären Peaks bei 2.2 und 2.9 min mit den in Abb.3 gezeigten UV-Spektren zu erwarten gewesen. Wahrscheinlich handelt es sich bei den beiden Peaks analog zu den Doppelpeaks A/B und C/D um Tiglin- bzw. Angelicasäure-haltige Deacetylverbindungen.

Die beschriebene Gleichgewichtseinstellung konnte durch die Bestimmung der Flächenzu- bzw. abnahme der entsprechenden Peaks durch HPLC-Trennung des Reaktionsgemisches in bestimmten Zeitabständen verfolgt werden.

Die Summe der Flächen der Doppelpeaks A/B und C/D des unveränderten Aescins wurden als 100% gesetzt und die Flächenabnahme in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer bestimmt. Gleichzeitig wurden die Zunahmen der Summe der Peakflächen a-f (Kryptoaescin) und der Peaks bei 3.5/3.9 min (Deacetylverbindungen) gemessen. Die erhaltenen Flächenwerte wurden in einem Diagramm gegen die Reaktionszeit aufgetragen (Abb.12).

Nach einer Reaktionsdauer von 1.5 - 2 Std. pendelt sich die Menge nicht umgesetzten β -Aescins zwischen 15 und 20% der eingesetzten Menge ein. Es war zu erwarten, daß parallel zur Abnahme des β -Aescins ein asymptotischer Anstieg des Kryptoaescins bis zu einem Maximalwert erfolgte. Die Menge an 28-O-Acetylverbindungen (Kryptoaescin) erreicht nach etwa 1½ Std. ihren Höhepunkt und beginnt

dann langsam wieder abzufallen. Dieser Abfall ist mit einer offensichtlich schon von Anfang an einsetzenden Deacetylierung zu erklären. Offenbar geht die Deacetylierung ausschließlich oder größtenteils auf Kosten des Kryptoaescins, da nur hier eine Abnahme festzustellen ist. Daraus folgt, daß die alkalische Abspaltung der Säuren in folgender Reihenfolge ablaufen dürfte:

1. Wanderung der Acetylgruppe von 22α -OH nach 28-OH
2. Abspaltung der 28-O-Acetylgruppe
3. Abspaltung der Tiglin- bzw. Angelicasäure und Bildung der Deacetylsaponine.

Durch diese Ergebnisse war bewiesen, daß die Peaks a-f im Extrakt (Abb.9) dem Kryptoaescin zuzuordnen sind.

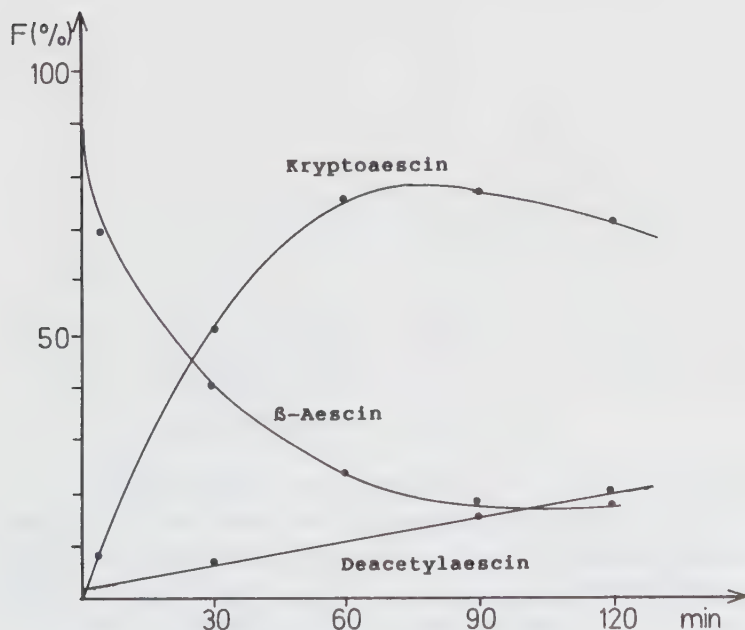


Abb.12: Verlauf der Umlagerung von β -Aescin

1.7 Quantitative Untersuchungen

1.7.1 Quantitativer Vergleich verschiedener Aescin-Chargen

Mit der beschriebenen Methode (TS 1) wurden vier β -Aescin-Chargen verschiedener Bezugsquellen (Roth, Madaus, Riedel de Haen, Institutssammlung) untersucht. Um fehlerhafte Ergebnisse durch unterschiedlichen Feuchtigkeits- oder Kristallwassergehalt auszuschließen, wurden die verschiedenen Chargen dreimal in Ethanol/Wasser umkristallisiert und 90 min bei 105°C getrocknet. Da eine direkte Bestimmung einzelner Aescinkomponenten wegen des Fehlens von Eichsubstanzen nicht möglich war, erarbeiteten wir zum quantitativen Vergleich verschiedener Chargen ein Verfahren über die Ermittlung **relativer Peakflächen (RPF)**. Die relative Peakfläche läßt sich von allen Verbindungen bestimmen, ohne daß eine Referenzsubstanz zur Verfügung stehen muß. Sie bezieht sich auf einen zugesetzten Standard und wird durch Einbeziehung der Standard- und Probeneinwaage korrigiert. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{E(s) \cdot F(x)}{F(s) \cdot E(p)} = RPF$$

$F(x)$	= Fläche des zu best. Peaks
$F(s)$	= Peakfläche des Standards
$E(s)$	= Standardeinwaage
$E(p)$	= Probeneinwaage

Als inneren Standard verwendeten wir p-Hydroxybenzoesäureethylester. In Tab.8 sind die relativen Peakflächen der Hauptkomponenten der untersuchten β -Aescin-Chargen wiedergegeben.

Die Chromatogramme der verschiedenen Chargen stimmten qualitativ gut überein, es traten jedoch beträchtliche quantitative Unterschiede bei einzelnen Komponenten auf, die nach dem vorher gesagten auf wechselnde Anteile an

Tab.8: Relative Peakflächen der Hauptkomponenten der untersuchten β -Aescin-Chargen bezogen auf die β -Aescin-Einwaage

Peak	(RPF $\cdot 10^{-3}$)				
	A/B	C/D	E	F	G
	39.2-43.2	17.3-26.4	5.3-7.3	0.1-6.2	4.8-9.2

Angelica- und Tiglinsäure-haltigen Saponinen zurückzuführen sind.

Der Gehalt von A/B liegt im Durchschnitt etwa doppelt so hoch wie jener von C/D. Die Komponenten E und G weisen etwa gleich hohe Werte auf, während F nur sehr niedrige Werte liefert. Auch bei der Ermittlung der Gesamtpeakflächen (Peak A-G, Abb.3) erhält man für die verschiedenen β -Aescin-Chargen bei gleicher Einwaage und gleichem Einspritzvolumen unterschiedliche Werte. Wie aus Tab.9 hervorgeht, unterscheiden sich die Gesamtpeakflächen pro mg um ca. 12%. Aescine mit höherem Anteil an Tiglinsäure-haltigen Saponinen liefern höhere Gesamtpeakflächen pro mg. Daraus ist abzuleiten, daß man bei einer quantitativen Bestimmung von Roßkastaniensaponinen mit kristallinem β -Aescin als Eichsubstanz je nach verwendeter Charge unterschiedliche Ergebnisse erhalten würde. Kristallines β -Aescin ist also in dieser Form als Eichsubstanz ungeeignet.

Tab.9: Gesamtpeakflächen pro mg verschiedener Aescin-Chargen

Aescin (Einwaage/5 ml)		Gesamtpeakfläche (A-G) FE/mg
Madaus	10.33 mg/5 ml	$51.92 \cdot 10^3$
Roth	4.90 mg/5 ml	$46.39 \cdot 10^3$
Instituts- sammlung	5.86 mg/5 ml	$48.03 \cdot 10^3$

1.7.2 Fingerprintanalyse und quantitativer Vergleich verschiedener Roßkastaniensamenextrakte und Fertigarz- neimittel

Für einige Trockenextrakte, die teils durch Methanolextraktion (siehe exp. Teil) selbst gewonnen, teils von Firmen bezogen wurden, sowie zwei Roßkastanienextrakte, die als Fertigarzneimittel im Handel sind, wurden wie vorher beschrieben die relativen Peakflächen (RPF) ermittelt. In Abb.13 sind wie in Abb.9 typische Chromatogramme der Fingerprintanalyse von Trockenextrakten wiedergegeben. Die Chromatogramme in Abb.9 und Abb.13 erhielten wir mit zwei Trennsäulen genau gleichen Typs (LiChrospher 100CH-18/2, 125-4, Merck). Die gute Auftrennung von A/B und C/D in Doppelpeaks gelang mit einer später bezogenen Säule nicht in gleichem Maße. Hier waren nur deutliche Schultern zu erkennen. Außerdem war eine etwas höhere Acetonitrilkonzentration nötig, um die Trennung zu reproduzieren. Die Trennmaterialien weisen also von Charge zu Charge geringfügige Unterschiede in ihren Trenneigenschaften auf. Bei Inbetriebnahme einer neuen Trennsäule ist es deshalb nötig, die Trennung zu überprüfen und gegebenenfalls die Bedingungen etwas zu korrigieren. Abb.13 zeigt zwei qualitativ ähnliche Chromatogramme zweier Trockenextrakte. In beiden sind die Peaks des Kryptoaescins und der deacetylierten Saponine erkennbar. Eine Ausnahme stellt der von uns aus Drogenmaterial der Fa. Birkenweg hergestellte Trockenextrakt dar. Er enthält nur geringe Mengen an Kryptoaescin. Eine Zuordnung von Peak a und b konnte hier wegen der geringen Menge nicht getroffen werden.

In Tab.10 sind die relativen Peakflächen der untersuchten Extrakte bezogen auf ihren Gesamtsaponingehalt (ermittelt nach Abschnitt 1.7.3) aufgeführt.

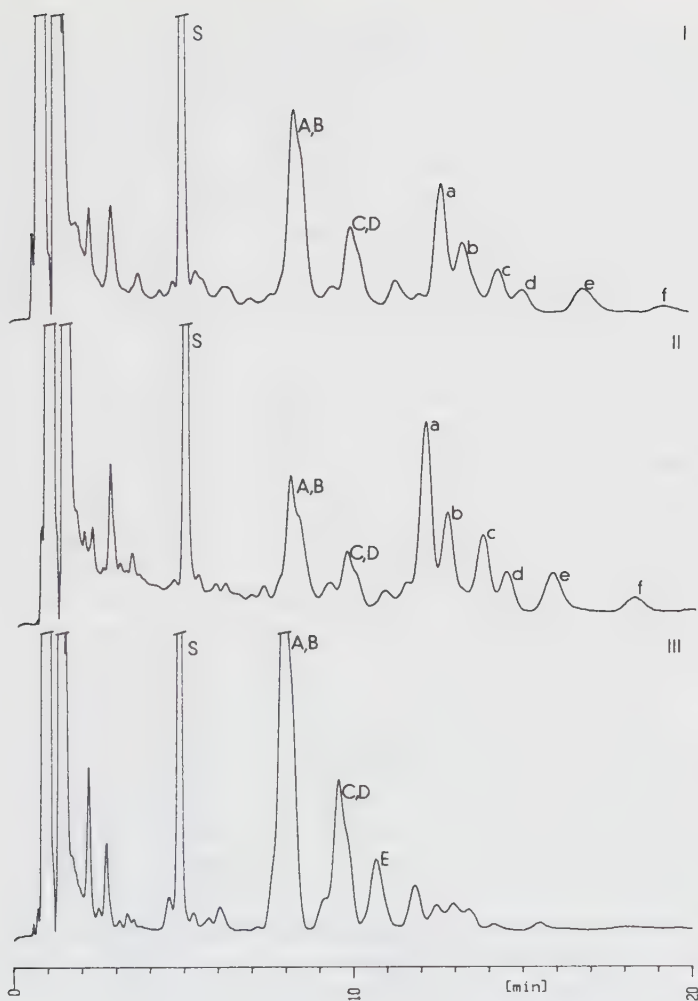


Abb.13: HPLC-Fingerprints von Roßkastanienextrakten
 (TS 1) I Trockenextrakt Fa. Birkenweg
 II Trockenextrakt Fa. Finzelberg
 III selbstgewonnener Extrakt aus Droge
 Fa. Birkenweg

Tab.10: RPF von Roßkastanienextrakten bezogen auf den
Gesamtsaponingehalt¹

Probe	A/B	C/D	E	RPF ($\cdot 10^{-3}$)					
				a	b	c	d	e	f
1 Extrakt (Droge aus Institutsbeständen)	17.2	10.9	2.1	15.4	10.0	9.4	5.0	3.6	2.0
2 Extrakt (Droge Fa. Finzelberg 5008500)	36.0	17.3	5.7	1.3	-	1.9	-	0.5	-
3 Extrakt (Droge Fa. Birkenweg 142/6)	37.1	16.6	6.8	3.9	2.0	2.5	-	0.7	-
4 Extrakt (Fa. Finzelberg 1346531)	14.3	7.2	0.7	12.7	6.5	5.9	3.0	5.0	1.8
5 Extrakt (Fa. Birkenweg 144/6)	24.7	13.8	4.0	12.0	8.2	4.7	2.4	3.1	-
6 Urtinktur (DHU Ch.-B. 23041)	14.6	9.5	1.2	25.7	13.6	13.6	6.1	5.8	2.5
7 Venostasin-Tropfen (Ch.-B. 462161)	16.1	8.1	1.6	12.2	7.8	6.7	2.9	3.3	1.9

¹ bestimmt nach Abschnitt 1.7.3

Da die jeweils erhaltenen relativen Peakflächen (RPF) auf die Gesamtsaponinmenge bezogen sind, ist ein direkter quantitativer Vergleich der Einzelkomponenten möglich. Man erhält - die Proben 2 und 3 ausgenommen - ein relativ einheitliches Bild. Die Analysen zeigen, daß der prozentuale Anteil an β -Aescinpeaks (A-E) meist nur zwischen 30 und 60% liegt. Das Kryptoaescin (Peaks a-f) macht entsprechend mit 40 bis 70% den Hauptanteil aus. Die Proben 2 und 3 enthielten nur sehr geringe Mengen an Kryptoaescin.

Die Unterscheidung von β -Aescin und Kryptoaescin ist von Bedeutung, da nach HAMPEL u. Mitarb. (73) Kryptoaescin in den von ihnen durchgeführten pharmakologischen Tests (antiödematöse Wirkung) erheblich geringere Wirksamkeit bei gleichzeitig verringerter Toxizität aufwies.

Die Fingerprintanalyse ermöglicht es, die durch partielle Hydrolyse entstehenden Folgeprodukte (Kryptoaescin, teilweise und vollständig deacylierte Saponine) zu erfassen. Als Beispiel zeigt Abb.14 die Chromatogramme (TS 1) der Fertigarzneimittel Reparil-Gel und Venostasin-Gel (Probenvorbereitung s. exp. Teil).

Beide Präparate enthalten laut Deklaration durch Isolierung erhaltenes β -Aescin. Wie Abb.14 zeigt, sind in beiden Gelen die für Extrakte typischen Kryptoaescinpeaks (a-f) nachweisbar. Die mit "Sal" gekennzeichneten Peaks sind nach den UV-Spektren den in den Präparaten enthaltenen Salicylsäurederivaten zuzuordnen. Der Peak bei 20.0 min bei Reparil-Gel konnte nicht zugeordnet werden. Da das Aescin in einer wäßrig-alkoholischen Gelgrundlage gelöst vorliegt, kommt es offenbar bei der Lagerung zu den beschriebenen Umlagerungsreaktionen. Eine hydrolytische Abspaltung einer oder beider Säuren war in diesen Präparaten dagegen nicht feststellbar.

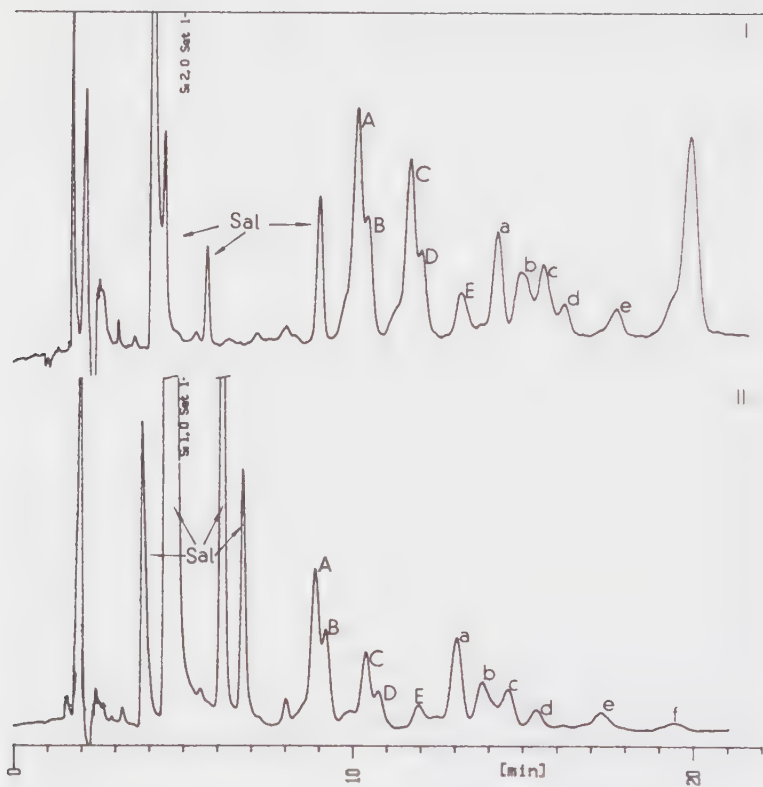


Abb.14: HPLC-Fingerprint von Reparil^R-Gel (I, TS 1, leicht modifiz.) und Venostasin^R-Gel (II, TS 1)

1.7.3 Bestimmung des Gesamtsaponingehalts über die Deacylsaponine

1.7.3.1 Vorausgehende Untersuchungen

Da aufgrund der in 1.7.1 erhaltenen Ergebnisse β -Aescin als Eichsubstanz ausschied, versuchten wir, die Aesculus-Saponine in ihrer Gesamtheit über die Deacylsaponine zu erfassen. Da die Unterschiede bei verschiedenen Aescin-Chargen durch unterschiedliche Anteile an Angelica- bzw. Tiglinsäure-haltigen Saponinen zustandekommen, versuchten wir, durch alkalische Hydrolyse ein Deacylsaponingemisch zu gewinnen. Da die bei der Säureabspaltung entstehenden Saponine sich in ihrem Chromophor nicht, und in ihren Molekulargewichten nur sehr geringfügig voneinander unterscheiden, erschien uns ein durch alkalische Hydrolyse von β -Aescin erhaltenes Gemisch als Eichsubstanz grundsätzlich geeignet.

Verschiedene Aescin-Chargen wurden mit 0.1N Kalilauge hydrolysiert, und das Reaktionsgemisch zur Entfernung der Lauge und der abgespaltenen Säuren durch eine Sep-Pak- C_{18} -Kartusche gespritzt. Nach dem Durchspritzen von zehn ml Wasser wurden die auf der Kartusche haftenden Verbindungen mit Methanol eluiert.

Zur HPLC-Trennung eignete sich ein Gradientensystem von 22 auf 28% Acetonitril unter Phosphorsäurezusatz (TS 4). Die Detektion erfolgte bei 200 nm.

Abb.15 zeigt die HPLC-Trennung des bei der alkalischen Hydrolyse von β -Aescin erhaltenen Gemisches mit den entsprechenden UV-Spektren. Es waren sechs Peaks mit exakt dem gleichen UV-Spektrum nachweisbar. Die Reaktion war offenbar quantitativ verlaufen, da keine Verbindungen mit den für β -Aescin typischen UV-Spektren mehr nachweisbar waren. Die Hauptverbindung (Peak 3) machte etwa 80%, die Peaks 4,5 und 6 zusammen etwa 20% der Gesamtfläche (Peak 1-6) aus. Dieses Verhältnis stimmt mit dem in der

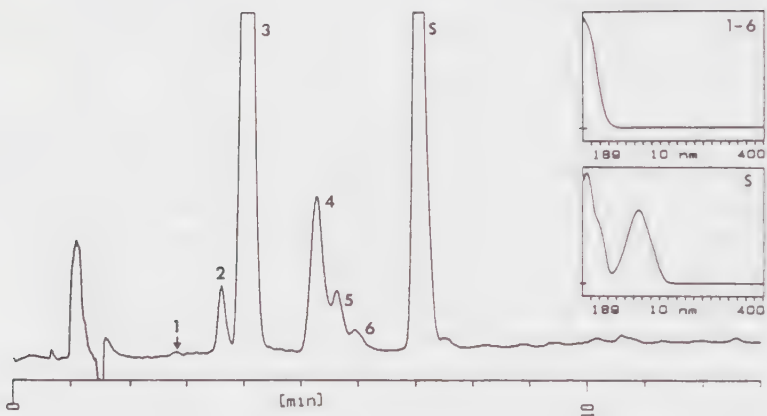


Abb.15: HPLC-Trennung des alkalischen Hydrolysats von β -Aescin (TS 4) mit den entspr. UV-Spektren

Literatur (60) angegebenen Mengenverhältnis der Aglykone Protoaescigenin und Barringtogenol C überein. Dieser Befund und das chromatographische Verhalten legten den Schluß nahe, daß es sich bei Peak 3 um Protoaescigeninglykoside und bei Peak 4,5,6 um Barringtogenol-C-Glykoside handelt. Peak 3 wies bei geringerer Einspritzmenge zwei Schultern auf, war also nicht einheitlich. Spätere Untersuchungen an isolierten Fraktionen bestätigten diese Zuordnung (siehe 1.8).

Die verschiedenen Aescin-Chargen gaben nach der Hydrolyse ein einheitliches Bild: Es waren jeweils alle sechs Peaks nachweisbar und auch die Mengenverhältnisse stimmten gut überein. Die durch Addition der Peakflächen von Peak 1-6 und Division durch die Einwaage erhaltenen Werte wurden verglichen.

Aus Tab.11 geht hervor, daß zwischen den einzelnen β -Aescin-Chargen nur eine Abweichung von etwa 1% auftritt.

Tab.11: Vergleich der Gesamtpeakflächen 1-6 von alkalisch hydrolysierten β -Aescinen bezogen auf die Einwaage

β -Aescin (Einwaage/5 ml)		Gesamtpeakfläche 1-6 FE/mg
Madaus	8.77 mg	$18.01 \cdot 10^3$
Roth	8.81 mg	$17.85 \cdot 10^3$
Instituts- sammlung	9.19 mg	$18.07 \cdot 10^3$

β -Aescine verschiedener Herkunft ergeben also nach alkalischer Hydrolyse einheitliche Deacylsaponingemische, die als Eichgemische geeignet sind.

Nach alkalischer Hydrolyse von Trockenextrakten ergaben sich äußerst ähnliche Chromatogramme.

Es traten alle sechs Peaks in praktisch gleichem Flächenverhältnis wie bei β -Aescin auf. Im Hydrolysat von Extrakten trat Peak 1 meist in größerer Menge als bei β -Aescin, Peak 6 nur als Schulter in der absteigenden Flanke von Peak 5 auf. Die im unhydrolysierten Extrakt auftretenden Flavonoide waren in der Probelösung nicht mehr nachweisbar. Sie wurden bei der Probenvorbereitung als wasserlösliche Salze aus der Sep-Pak-Kartusche eluiert. Die Deacylsaponine, die ebenfalls als Salze der im Zuckeranteil gebundenen Glucuronsäure vorliegen, besitzen ausreichend lipophile Eigenschaften, um nicht eluiert zu werden. Es resultiert eine von nicht saponinischen Verbindungen weitgehend befreite Probelösung.

Auch die alkalischen Hydrolysate von entsprechenden Fertigarzneimitteln ergaben gleichartige Chromatogramme. Die Methode schien deshalb zur quantitativen Bestimmung des Gesamtsaponingehalts in Drogen, Extrakten und Fertigarzneimitteln geeignet.

Weitere Voruntersuchungen bezogen sich auf die Bedingun-

gen der alkalischen Hydrolyse und die Probenvorbereitung. Wir stellten fest, daß die alkalische Hydrolyse mit wäßriger 0.1N Kalilauge nach 15-minütigem Erhitzen unter Rückfluß vollständig war. Die Probenvorbereitung mit Sep-Pak wurde anhand von β -Aescin und Extrakten in Bezug auf die Kapazität der Kartusche und auf eventuelle Verluste an Deacylsaponinen durch vorzeitige Elution mit Wasser dünnschichtchromatographisch (DC TS 1) überprüft. Es zeigte sich, daß die Kapazität bei einer Aescinmenge von etwa 25 mg erschöpft war. Da bei Überschreitung dieser Menge Aescin vorzeitig eluiert wird, sollten nicht mehr als 10 mg verwendet werden. Aus den gleichen Gründen ist eine Trockenextrakteinwaage von unter 50 mg einzuhalten. Weiterhin war festzustellen, daß das Trennmateri-

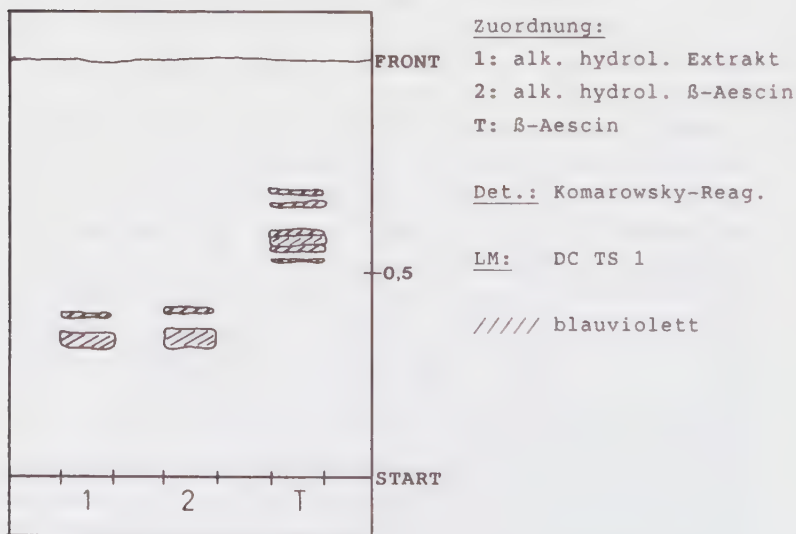


Abb.16: DC-Trennung des alkalischen Hydrolysats von β -Aescin und eines Extraktes nach der Probenvorbereitung

der Sep-Pak-C₁₈-Kartusche durch das alkalische Medium relativ schnell geschädigt wird. Die Kartusche ist deshalb nur einmal verwendbar. Bei Einhaltung der gewählten Bedingungen traten keine Verluste an Saponinen auf. Abb.16 zeigt die DC-Trennung von alkalisch hydrolysiertem Extrakt und β -Aescin nach der Probenvorbereitung sowie zum Vergleich die Trennung von kristallinem β -Aescin (DC TS 1).

Bei den Hydrolyseprodukten treten nur eine breite, den Deacylsaponinen entsprechende Hauptzone und zwei sehr schwache Nebenzonen auf.

1.7.3.2 Eichgeraden, Standardkorrekturfaktor, Wiederfindungsrate

Als Eichgemisch diente alkalisch hydrolysiertes β -Aescin. Nach der Hydrolyse und Probenvorbereitung wurde p-Hydroxybenzoesäuremethylester als innerer Standard zugesetzt. Die bei der HPLC-Analyse erhaltenen Flächen der Peaks 1-6 wurden addiert. Durch Einspritzen unterschiedlicher Mengen der Eichlösung wurde die Eichgerade erstellt (Abb.17).

Wie die Abbildung zeigt, besteht im Bereich zwischen etwa 5 μg und 25 μg lineare Abhängigkeit der Gesamtpeakfläche Peak 1-6 von der Einspritzmenge.

Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0.4 μg . Die ermittelten Standardkorrekturfaktoren aus 3 Bestimmungen sind in Tab.12 aufgeführt.

Um das gesamte analytische Verfahren einschließlich der alkalischen Hydrolyse und der Probenvorbereitung zu prüfen, wurde die Wiederfindungsrate bestimmt. Hierzu bestimmten wir mit Hilfe des angeführten Standardkorrekturfaktors den Gesamtsaponingehalt eines in Methanol gelösten Extraktes. In einem zweiten Analysengang setzten wir zur genau gleichen Menge des Extraktes eine definierte Menge kristallinen β -Aescins zu und bestimmten eben-

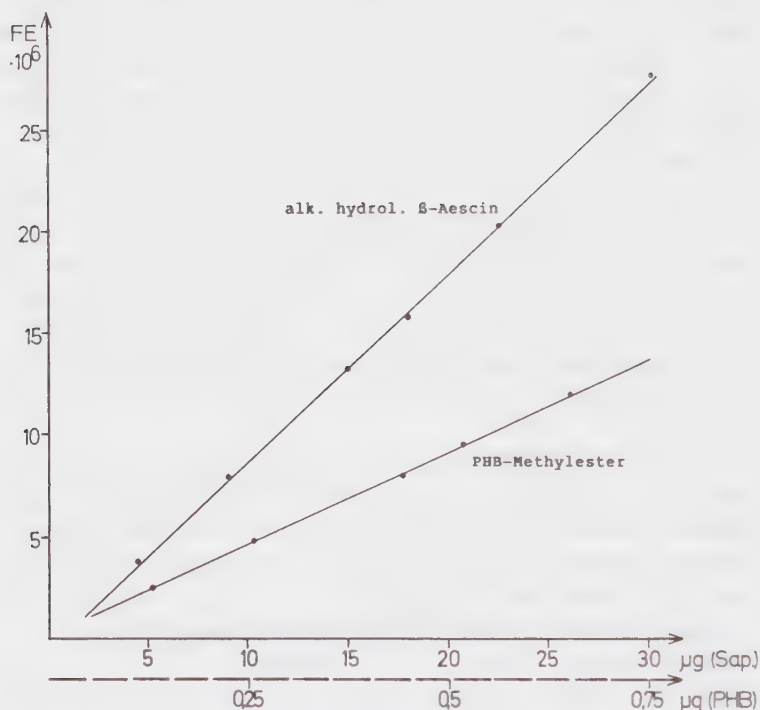


Abb.17: Eichgeraden von alkalisch hydrolysiertem β-Aescin und dem inneren Standard (PHB-Methylester)

falls den Gesamtsaponingehalt. Jede der beiden Proben wurde fünfmal eingespritzt. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet und die relative Standardabweichung errechnet.

Die Wiederfindungsrate betrug also 100.9% (vgl. Tab.13), woraus folgt, daß die Analysenmethode mit alkalischer Hydrolyse und Aufarbeitung mit einer Abweichung von etwa 1% reproduzierbar ist.

Tab.12: Standardkorrekturfaktoren für alkalisch hydrolysiertes β -Aescin mit PHB-Methylester als innerem Standard

	$f(\cdot 10^{-2})$	
1	4.763	$F(su) \cdot E(st)$
2	4.789	$f = \frac{\quad}{\quad}$
3	4.772	$F(st) \cdot E(su)$
Mittelwert:	4.778	$F(su)$ = Peakfläche Substanz $F(st)$ = Peakfläche Standard $E(su)$ = Einwaage Substanz $E(st)$ = Einwaage Standard

Tab.13: Ermittlung der Wiederfindungsrate

Probe	Gehalt	s_{rel}
Extrakt 0.5 ml	7.68 mg	0.38%
Extrakt 0.5 ml + 5.47 mg umkrist. β -Aescin	13.20 mg	0.35%

1.7.3.3 Bestimmung des Gesamtsaponingehalts von Extrakten und Fertigarzneimitteln

Wir verwendeten bei allen Bestimmungen die Methode des inneren Standards mit PHB-Methylester als Standardsubstanz. Aus fünf Einspritzungen wurde für jede Probe die relative Standardabweichung ermittelt. Die erhaltenen Werte beziehen sich auf kristallines β -Aescin. Die Ergebnisse sind in Tab.14 a bzw. b aufgeführt.

Tab.14 a: Gesamtsaponingehalt in Drogen und
Trockenextrakten

Probe	Gehalt bezogen auf		s _{rel}
	Extrakteinwaage	Drogeneinwaage	
1	22.9%	5.0%	2.7%
2	19.9%	4.8%	2.3%
3	13.0%	2.8%	-
4	18.7%	-	1.8%
5	17.9%	-	0.9%

1,2,3 aus Drogenmaterial selbst extrahiert; Droge bzw.
Extrakt bezogen von Fa. Finzelberg (1, 5) und Fa.
Birkenweg (2, 4)

Tab.14 b: Gesamtsaponingehalt in Fertigarzneimitteln

Probe	deklarerter Gehalt	gefundener Gehalt	s _{rel}
1 Venostasin Tropfen	7.3 mg/ml	7.2 mg/ml	1.25%
2 Vasotonin Tropfen	mind. 17.5 mg/ml	15.6 mg/ml	0.65%
3 Urtinktur DHU	-	15.4 mg/ml	0.38%
4 Venoplant retard Drg.	50 mg/Drg.	38.9 mg/Drg.	1.80%

Der Saponingehalt in Hippocastani semen soll nach Angaben
des DAB 8 (89) mindestens 3%, berechnet als wasserfrei-
es Aescin, betragen. SZILAGYI (85) gibt für die Droge
einen Gehalt zwischen 2.8 und 5.5% an. Für Roßkastanien-
samenextrakte finden sich in der Literatur (88, 90, 91,
92) Werte zwischen 13 und 19%, in den meisten Fällen um

17%. Die von uns gefundenen Werte (Tab.14 a) liegen ebenfalls in diesem Rahmen. Da nach unserer Erfahrung die Extraktausbeute um 20% der Drogeneinwaage liegt, ist bei Roßkastaniensamen mit einem Saponingehalt von durchschnittlich 3-5% zu rechnen. Es besteht im Einzelfall also durchaus die Möglichkeit, daß der vom Arzneibuch vorgeschriebene Mindestgehalt unterschritten wird (Probe 3, Tab.14 a).

Die durch die HPLC-Methode erhaltenen Werte von Fertig-
arzneimitteln (Tab.14 b) waren dagegen stets niedriger als nach der Deklaration zu erwarten war. Bei Präparat 1 wurde der deklarierte Gehalt nur geringfügig, bei Präparat 2 und 3 jedoch um 11 bzw. 23% unterschritten.

1.7.3.4 Vergleich der HPLC-Bestimmung mit der Bestimmungsmethode des DAB 8 (89)

Die bisher am häufigsten angewendete Methode zur Bestimmung des Saponingehalts in Roßkastaniensamenextrakten ist die photometrische Bestimmung nach SCHLEMMER (88), die in modifizierter Form in das DAB 8 Eingang gefunden hat. Der Unterschied der beiden Methoden besteht vor allem darin, daß die Auswertung nach SCHLEMMER über eine mit kristallinem Aescin aufgestellte Eichgerade, nach dem Arzneibuch über eine festgelegte spezifische Extinktion erfolgt. Zum Vergleich bestimmten wir einen Extrakt nach der DAB-8-Methode (3 Bestimmungen) und der HPLC-Methode. Die Auswertung erfolgte bei der photometrischen Bestimmung über die spezifische Extinktion und über eine zusätzlich aufgestellte Eichgerade. Zum Vergleich der Ergebnisse wurde der durch HPLC ermittelte Gehalt willkürlich als 100% gesetzt.

Tab.15 zeigt, daß die photometrische Methode zu überhöhten Werten führt. Die über die Eichgerade (Aescinstandard) erhaltenen Werte liegen niedriger als die mit Hilfe der spezifischen Extinktion ermittelten. Die Arznei-

Tab.15: Korrelation der HPLC-Methode mit der Arzneibuch-
methode

Relativer Gehalt bestimmt durch		
HPLC	DAB 8 (Extinktion)	DAB 8 (Eichgerade)
100%	117.3%	109.6%

buchmethode stellt eine Konventionsmethode dar, bei der in jedem Fall ein Aescinstandard mitbestimmt werden sollte, um Fehler z.B. durch geringe Unterschiede in der Zusammensetzung des stark hygroskopischen Eisen(III)-chlorid/Schwefelsäure/Essigsäure-Reagenzes zu vermeiden. Überhöhte Werte können dadurch zustandekommen, daß bei der Ausschüttelung störende Begleitstoffe wie Zucker oder Flavonoide, die in den Extrakten in relativ großer Menge enthalten sind und mit dem Reagenz ebenfalls Farbreaktionen eingehen (87), nur unvollständig abgetrennt werden. Bei der HPLC-Methode werden selektiv nur die bei der alkalischen Hydrolyse aus den genuinen Saponinen hervorgehenden Deacylsaponine erfaßt. Eine Miterfassung von Zuckern oder Flavonoiden ist ausgeschlossen. Durch eventuelle Abbauvorgänge auftretende zuckerärmere Saponine oder Aglykone werden nicht erfaßt.

Die bei den Handelspräparaten 3 und 4 durch die HPLC-Methode ermittelten Abweichungen von der Deklaration bewegen sich ebenfalls im Rahmen des von uns bei der DAB-8-Methode gefundenen Fehlerbereiches (Tab.15). Ein Analysengang (Trockenextrakt) dauert mit Hydrolyse, Probenaufarbeitung und HPLC-Trennung etwa 35 min. Eine Bestimmung nach dem Arzneibuch erfordert mehrere Stunden.

1.8 Strukturelle Untersuchungen an Aescinfraktionen

Zur genauen strukturellen Zuordnung der bei den HPLC-Trennungen erhaltenen Peaks wurden die Substanzen der Doppelpeaks A/B und C/D (Abb.3) sowie des Hauptpeaks 2 und der Nebenpeaks 4,5,6 des alkalisch hydrolysierten Aescins (Abb.15) durch semipräparative HPLC im Mikrogrammaßstab isoliert und durch DC-, GC- und FAB-massenspektrometrische Untersuchung charakterisiert.

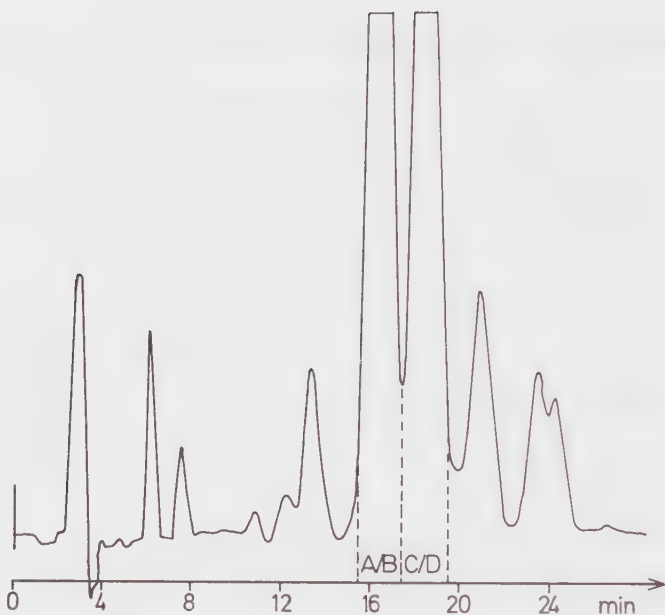
1.8.1 Charakterisierung von Fraktionen aus kristallinem β -Aescin (Doppelpeaks A/B und C/D)

1.8.1.1 Isolierung

Die Isolierung erfolgte über semipräparative HPLC mit 38.5% Acetonitril unter Zusatz von Phosphorsäure auf RP-Material in isokratischer Arbeitsweise (TS 5). Der Zusatz der Phosphorsäure erwies sich für die Trennung als absolut notwendig. Es konnten jeweils nur etwa 35 μ l (5 mg Aescin/ml) eingespritzt werden.

Abb.18 zeigt, daß die semipräparative Trennung, wie zu erwarten war, bedeutend schlechtere Auflösung der Peaks ergab. Die auf der analytischen Säule als Doppelpeaks A/B und C/D getrennten Substanzen erschienen bei der semipräparativen Trennung als zwei unvollständig aufgelöste, scheinbar einheitliche Peaks. Die erhaltenen amorphen Substanzen (A/B und C/D) wurden dünnschichtchromatographisch untersucht (DC TS 1).

Die isolierten Substanzen A/B und C/D ergaben jeweils eine Zone (mit geringen Verunreinigungen), die jedoch identische R_f -Werte aufwiesen.



Zuordnung:

T: β -Aescin

Det.: Komarowsky-Reag.

LM: DC TS 1

///// blauviolett

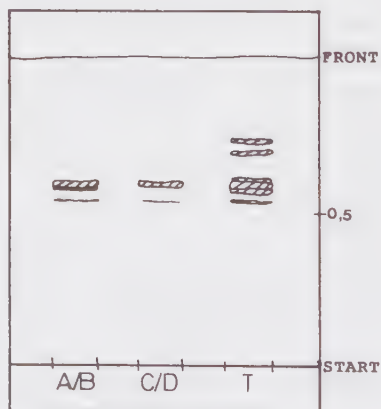


Abb.18: Semipräparative HPLC-Trennung von β -Aescin (TS 5) und dünnschichtchromatographische Zuordnung

1.8.1.2 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Substanzen A/B und C/D

Zur Charakterisierung des Zuckeranteils und der Aglykone von Substanz A/B und C/D führten wir je eine Mikrohydrolyse auf der DC-Platte (97) durch. Dabei wurde die DC-Platte mit bereits aufgetragenen Untersuchungs- und Vergleichssubstanzen heißen Salzsäuredämpfen ausgesetzt (siehe exp. Teil) und danach entwickelt. Mit dieser Methode können Substanzmengen im μg -Bereich untersucht werden.

Zur Erfassung der Zucker wurde im Laufmittelsystem Chloroform : Methanol : Wasser (64 : 40 : 8, DC TS 2) entwickelt und mit Diphenylaminophosphorsäure-Reagenz detektiert (Abb.19 a). In beiden Substanzen waren Xylose, Glucose, Galaktose und Glucuronsäure nachweisbar. Zusätzlich trat Glucuronsäurelacton auf, das unter diesen Bedingungen aus Glucuronsäure gebildet wird. In gleicher Weise wurden die bei der Mikrohydrolyse entstehenden Spaltprodukte im Laufmittelsystem Dichlormethan : Ethylacetat : Methanol (10 : 3 : 4, DC TS 3) auf Sapogenine untersucht. Bei beiden Substanzen war durch Vergleich mit authentischer Substanz Protoaescigenin nachweisbar (Abb. 19 b). Barringtogenol C stand uns als Vergleichssubstanz nicht zur Verfügung. Die Zonen bei $R_f = 0.3$ und 0.4 stammen vermutlich von nicht vollständig hydrolysierten Saponinen.

Da bei Substanz A/B und C/D gleiche Zucker und das gleiche Aglykon vorlagen, konnten sie sich also nur im Säureanteil (Angelica- oder Tiglinsäure) unterscheiden.

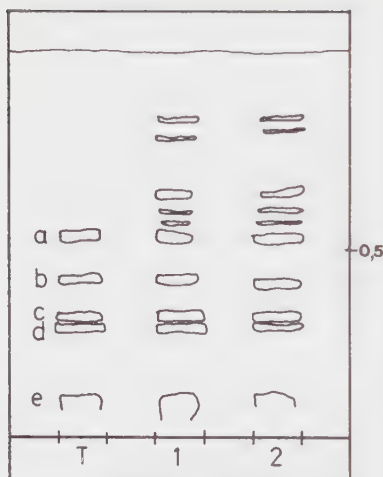


Abb.19 a

Zuordnung:

T: Testgemisch

a Glucuronsäurelacton

b Xylose

c Glucose

d Galaktose

e Glucuronsäure

1: Fraktion A/B

2: Fraktion C/D

Det.: Diphenylaminophosphor-
säure-Reagenz

LM: DC TS 2



Abb.19 b

Zuordnung:

T: Protoaescigenin

1: Fraktion A/B

2: Fraktion C/D

Det.: Komarowsky-Reag.

LM: DC TS 3

///// blauviolett

Abb.19 a/b: Mikrohydrolyse von Fraktion A/B und C/D,
Nachweis der Zucker (a) und der Aglykone (b)

1.8.1.3 FAB-massenspektrometrische Untersuchungen der Substanzen A/B und C/D

Um nicht-flüchtige oder thermisch labile Verbindungen wie Glykoside, Oligosaccharide oder Peptide der massenspektrometrischen Untersuchung ohne vorherige Derivatisierung zugänglich zu machen, wurden in neuerer Zeit verschiedene Ionisationsmethoden entwickelt. Einen Überblick über diese Ionisationsmethoden, von denen neben der Feld-Desorption (FD), Desorption Chemical Ionisation (DCI) und der Sekundärionen-Technik (SIMS) vor allem die Fast-Atom-Bombardment-Ionisation besondere Bedeutung erlangt hat, gibt NIBBERING (98).

Die von BARBER (99) entwickelte FAB-Massenspektrometrie besteht darin, daß die in einer Matrix (Glycerin, Polyethylglycol 200) gelöste Probe mit einem Strahl neutraler Argon- oder Xenon-Atome beschossen wird. Dadurch werden positive und negative Ionen erzeugt, die aus der Matrix herausgeschleudert werden. Positive und negative Ionen werden getrennt registriert. Einen Überblick über die apparativen Aspekte gibt die Literatur (99, 100, 101, 102).

Besondere Bedeutung besitzt die Methode bei der Molekulargewichtsbestimmung großer polarer Moleküle. Im Routinebetrieb lassen sich Molekulargewichte von 300 bis etwa 2000 bestimmen (103), es wurden jedoch auch Oligosaccharide mit Molekulargewichten von über 3000 (104) und Peptide bis ca. 6000 (100) erfolgreich untersucht.

Typisch für die FAB-Massenspektrometrie ist das Auftreten von Pseudomolekülionen $M-H$ bei Negativ-Ionen-Registrierung, $M+H$ bei Positiv-Ionen-Registrierung. Bei Zusatz von Spuren von Li^- oder Na^- Salzen zur Matrix treten $M+Li$ und $M+Na$ Cluster auf. Einen Nachteil stellen die sehr intensiven Matrix-Peaks dar, die die Auswertung der Spektren besonders im unteren Molekulargewichtsbereich erschweren.

Als Glykoside mit Molekulargewichten meist zwischen 700 und 1250 sind die Saponine für die FAB-massenspektrometrische Untersuchung prädestiniert. Neben der Molekulargewichtsbestimmung liefert die Methode durch die ebenfalls auftretende Fragmentierung (sukzessive Abspaltung von Monosaccharideinheiten) wichtige Informationen über den Kohlenhydratanteil und das Aglykon des Saponins. In jüngster Zeit wurden bereits einige Saponine FAB-massenspektrometrisch untersucht (105, 106, 107).

Es wurden FAB-Massenspektren der Substanzen A/B und C/D, sowie zum Vergleich, von β -Aescin aufgenommen. Da β -Aescin ein Gemisch darstellt, war mit dem Auftreten von mehreren Molekülionen zu rechnen. Für die Hauptbestand-

teile des β -Aescins ergaben sich rechnerisch die Molekulargewichte 1130, 1100, 1114 und 1084:

$M-H]^-$

- 1129 Hexose/Hexose/Hexuronsäure/Protoaescigenin/
Essigsäure/Angelica- bzw. Tiglinsäure
- 1099 Hexose/Pentose/Hexuronsäure/Protoaescigenin/
Essigsäure/Angelica- bzw. Tiglinsäure
- 1113 Hexose/Hexose/Hexuronsäure/Barringtogenol C/
Essigsäure/Angelica- bzw. Tiglinsäure
- 1083 Hexose/Pentose/Hexuronsäure/Barringtogenol C/
Essigsäure/Angelica- bzw. Tiglinsäure

Abb.20 zeigt, daß beim Aescin die $M-H]^-$ Molekülionen 1129, 1113 und 1099 eindeutig nachweisbar waren. Das Molekülion 1083 war wegen seines geringen Anteils im Aescin (<1%) nicht erkennbar. Das Ion der Masse 1089 war nicht zuzuordnen. Sukzessive Abspaltung von zwei Hexosen aus $M-H]^-$ 1129 führt zu den Fragmentationen 967 und 805. Das Fragmention 937 ist durch die Abspaltung der Hexose aus $M-H]^-$ 1099 zu erklären. Nach den DC-Untersuchungen von Substanz A/B und C/D war zu erwarten, daß hier ebenfalls die Molekülionen $M-H]^-$ 1129 und 1099, nicht jedoch 1113 auftreten.

Wie Abb.20 zeigt, konnte dies durch die FAB-Massenspektren der Substanzen A/B und C/D bestätigt werden. Damit war es gelungen, die bei der HPLC-Trennung des β -Aescins auftretenden Peaks (siehe Abb.3) weitgehend zu charakterisieren. Die in Tab.7 aufgrund der Mengenverhältnisse der Aglykone, des Retentionsverhaltens und des "Ratio-of-Signal" Plots (Abb.7) getroffene Zuordnung konnte also bestätigt werden.

NEG, GLYCZ

ESCIN.3 (TIC=637344, 100%=11372) EI

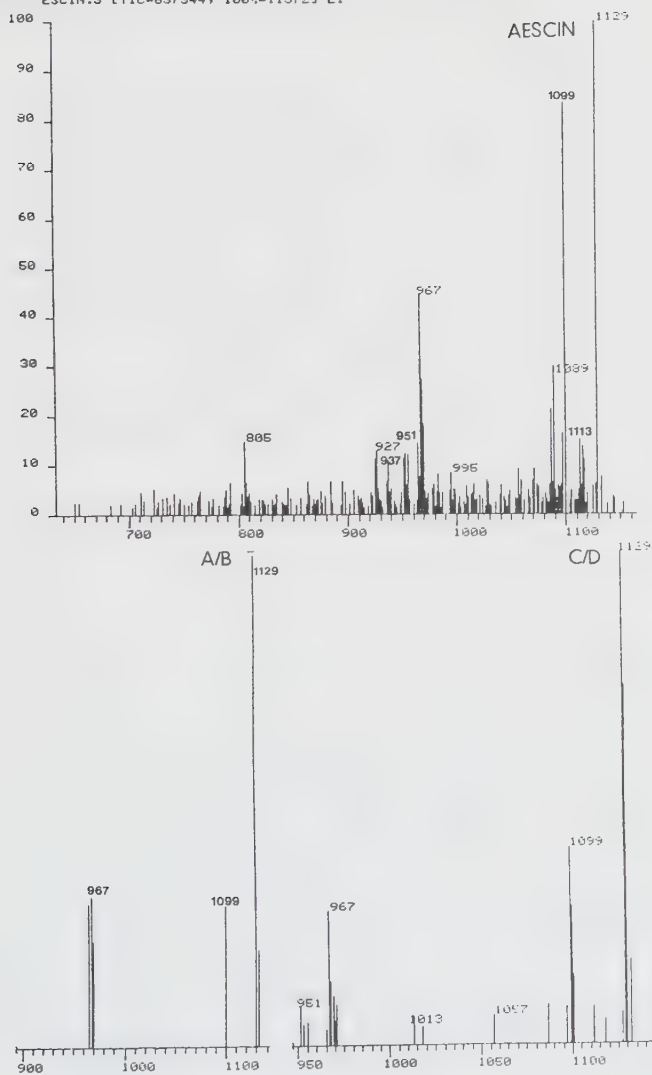


Abb.20: FAB-MS von β -Escin und den Fraktionen A/B und C/D (neg. Ionen)

1.8.2 Charakterisierung von Fraktionen aus Deacylaescin

1.8.2.1 Isolierung

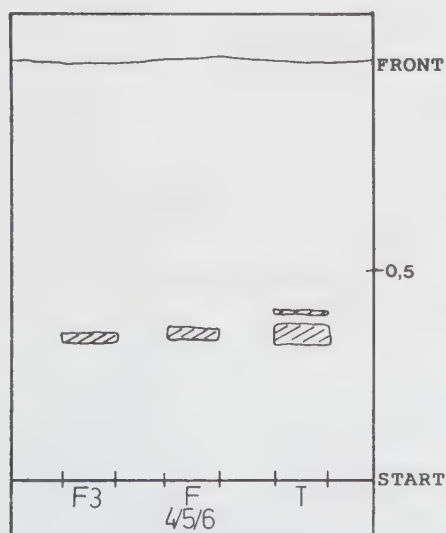
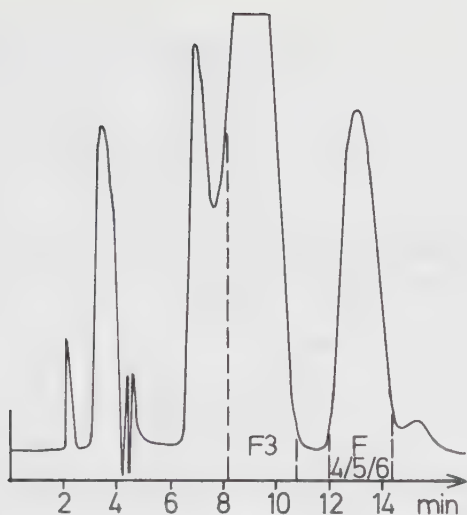
Die Isolierung erfolgte durch semipräparative HPLC mit 25% Acetonitril auf RP 18-Material in isokratischer Arbeitsweise (TS 6). Auf einen Säurezusatz konnte verzichtet werden. Es wurden jeweils 100 μ l eines wie bei der quantitativen Saponinbestimmung vorgereinigten alkalischen Hydrolysats (ca. 5 mg Deacylaescin/ml) eingespritzt. Die eingedampften Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht.

Die isolierten Fraktionen ergaben bei der DC-Trennung jeweils eine Zone, die sich im Rf-Wert geringfügig unterschieden.

1.8.2.2 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von Fraktion 3 und 4/5/6

Die Fraktionen wurden ebenfalls wie in 1.8.1.2 beschrieben untersucht. Das Ergebnis ist in Abb.22 a und b dargestellt.

Aus Fraktion 3 wurden als Aglykon Protoaescigenin und die Zucker Glucose, Xylose, Galaktose und Glucuronsäure erhalten, Fraktion 4/5/6 lieferte das Aglykon Barringtogenol C und die gleichen Zucker. Xylose war in Fraktion 4/5/6 jedoch nur in geringer Menge nachweisbar. Eine gaschromatographische Analyse (Alditolacetate) der nach saurer Hydrolyse erhaltenen Monosaccharide bestätigte dieses Ergebnis. Während bei Fraktion 3 auch die in der Literatur (60, 64) angegebenen Mengenverhältnisse der Zucker in Aescin in etwa wiedergefunden wurden, war Xylose in Fraktion 4/5/6 nur in sehr geringer Menge enthalten.



Zuordnung:

T: alkal. hydrol.
β-Aescin

Det.: Komarowsky-Reag.

LM: DC TS 1

///// blauviolett

Abb.21: Semipräparative HPLC-Trennung (TS 6) von Deacyl-aescin und Zuordnung der Fraktionen auf der DC

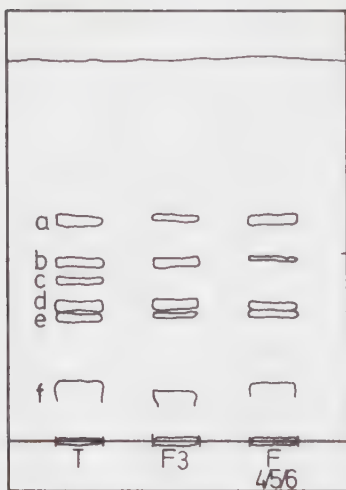


Abb.22 a

Zuordnung:

T: Testgemisch

a Glucuronsäurelacton

b Xylose

c Arabinose

d Glucose

e Galaktose

f Glucuronsäure

Det.: Diphenylaminophosphor-
säure-Reagenz

LM: DC TS 2

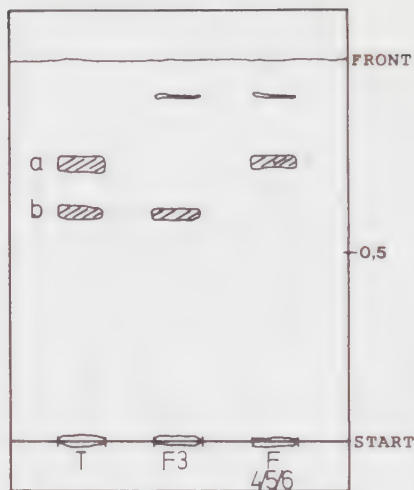


Abb.22 b

Zuordnung:

T: Test

a Barringtogenol C

b Protoaescigenin

Det.: Komarowsky-Reag.

LM: DC TS 3

Abb.22: Mikrohydrolyse von Fraktion 3 und 4/5/6, Nachweis
der Zucker (a) und der Aglykone (b)

1.8.2.3 FAB-massenspektrometrische Untersuchung von Fraktion 3

Rechnerisch ergaben sich für die Protoaescigeninglykoside
die Molekulargewichte 1006 und 976.

- 1005: $M-H]^-$ Protoaescigenin/Hexose/Hexose/Hexuronsäure
- 975: $M-H]^-$ Protoaescigenin/Hexose/Pentose/Hexuronsäure
- 843: $M-H]^-$ 1005-Hexose
- 813: $M-H]^-$ 975-Hexose
- 681: $M-H]^-$ 1005-2 Hexosen
- 505: Aglykon-H (Protoaescigenin-H)

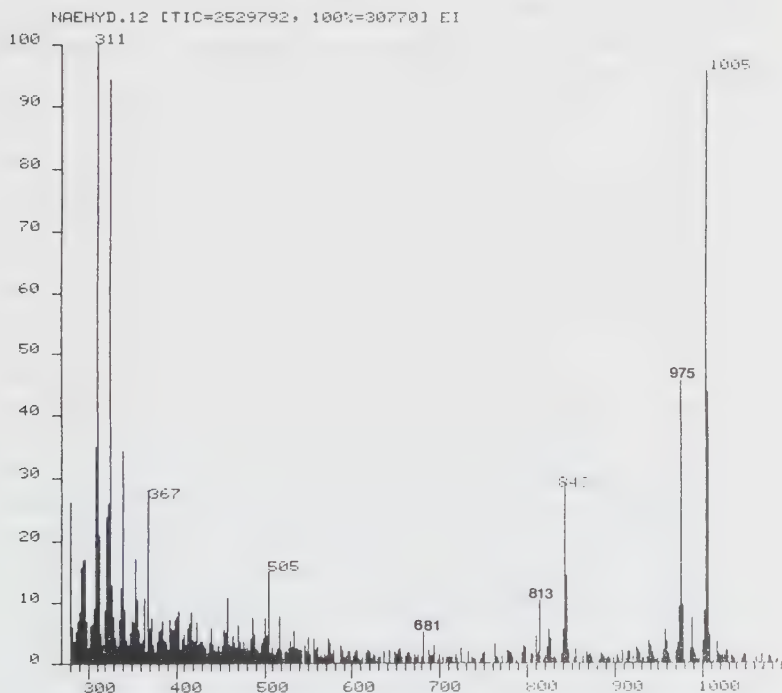


Abb.23: FAB-MS von Fraktion 3 (neg. Ionen) mit Zuordnung

Die Pseudomolekülonen waren eindeutig den Protoaescigeninglykosiden zuzuordnen. Das Aglykonfragment m/e 505 entsteht durch Abspaltung des gesamten Kohlenhydratanteils aus dem Saponin. Die Fragmente m/e 987 und 957 kommen durch Wasserabspaltung aus den entsprechenden Molekülonen zustande (Abb.23).

Somit konnten Peak 3 (Abb.15) die Protoaescigeninglykoside mit den im Aescin vorkommenden Zuckerketten und den Peaks 4/5/6 die entsprechenden Barringtonenol-C-Glykoside zugeordnet werden.

Diese Zuordnung macht die Grenzen der HPLC-Trennung von Saponinen deutlich: Bei Saponinen, die sich nur in der Art oder Verknüpfung der Monosaccharide, nicht jedoch in der Anzahl der Monosaccharideinheiten oder im Aglykon unterscheiden, ist bei der HPLC-Trennung mit unvollständiger Auflösung zu rechnen.

2. PRIMULAE RADIX

2.1 Botanik

2.1.1 Systematik und Verbreitung

Das DAB 8 läßt als Stammpflanzen für die Droge *Primulae radix* *Primula veris* L. und *Primula elatior* (L.) Hill. zu (89).

Die Gattung *Primula*, die etwa 540 Arten umfaßt, gehört zur Familie der *Primulaceae* (136). Bei beiden Arten werden zahlreiche Subspezies unterschieden. Sie sind in ganz Mitteleuropa bis Südschweden und im Balkan verbreitet. *P. veris* ist zusätzlich im ganzen östlichen Asien, Zentral- und Vorderasien anzutreffen (52).

2.1.2 Botanische Beschreibung

P. elatior ist eine ausdauernde Pflanze mit kräftigem Wurzelstock. Die grünen Pflanzenteile sind mit gegliederten Haaren bedeckt. Die Laubblätter sind zur Blütezeit 3-6 cm lang, runzelig und etwas nach rückwärts eingewellt. Die in vielblütigen Dolden angeordneten Blüten sitzen auf einem bis zu 30 cm langen Schaft. Der Kelch ist walzenförmig, enganliegend und scharfkantig. Die schwefelgelbe Krone gliedert sich in die Kronröhre und den weittrichterförmigen bis flachen Kronsaum mit einem Durchmesser von ca. 2 cm. *P. veris* unterscheidet sich von *P. elatior* durch den kürzeren Wurzelstock und Blüenschaft, den größeren, glockenförmig aufgeblasenen Kelch sowie die dottergelbe Blütenfarbe. Der Kronsaum ist bei *P. veris* glockig-konkav und im Durchmesser viel kleiner (ca. 1 cm) (52).



Abb.24: Habituszeichnung von *P. veris* und *P. elatior*,
nach HESS, LANDOLT und HIRZEL (162)

2.2 Inhaltsstoffe von *Primulae radix*

2.2.1 Chemie der Primulasaponine

Nach Untersuchungen von TSCHESCHE und ZIEGLER (108) aus dem Jahr 1963 leitet sich das Hauptsaponin des Saponin-gemisches von *P. elatior* von dem Oleanenderivat **Primula-genin A** ab. Die Zuckerkomponenten, die in verzweigtkettiger Anordnung vorlagen, wurden als Glucose, Galaktose, Rhamnose und Glucuronsäure identifiziert. Neben Primula-genin A wurden nach Säurehydrolyse in geringer Menge 13

weitere Sapogenine nachgewiesen und teilweise identifiziert. Nach schonender Glykosidspaltung (UV/Na-periodat) wurde als genuines Aglykon Protoprimulagenin A erhalten. Primulagenin A stellte demnach ein Artefakt dar. Weitere Aglykone wurden nicht beschrieben (109). Dabei konnte auch gezeigt werden, daß Protoprimulagenin A durch Säurebehandlung primär in Primulagenin A (109), und dieses wiederum in andere Artefakte umgewandelt wird. Von diesen wurden zwei als die Triterpene Aegiceradiol und Aegiceradienol beschrieben (110). TSCHESCHE und WIEMANN (111) bestätigten 1976 erneut die Zuckersequenz des Hauptsaponins. In einer kürzlich erschienenen Arbeit (112) wurde die Struktur der Zuckerkette des Hauptsaponins wieder revidiert und die in Abb.25 dargestellte Struktur vorgeschlagen. Ein ebenfalls untersuchtes Nebensaponin wies die gleiche Reihenfolge der Zucker jedoch in anderer Verknüpfungsweise auf.

Bei der Säurehydrolyse der weniger gut untersuchten Saponine von *P. veris* wurden 1966 Primulagenin A als Hauptsapogenin und daneben Priverogenin-A-monoacetat, Primulagenin D und weitere Spaltprodukte, sowie die gleichen Zucker wie bei *P. elatior* gefunden (113). KARTNIG und RI fanden nach Hydrolyse des gereinigten Saponingemisches aus *Primulae-radix*-Handelsdroge neben den schon erwähnten Zuckern zusätzlich noch Galakturonsäure, Arabinose und Xylose (114). Eine Untersuchung der genuinen Sapogenine aus *P. veris* unter Anwendung schonender Methoden der Glykosidspaltung steht noch aus.

Aus heutiger Sicht steht fest, daß die Säurehydrolyse der Primulasaponine zur Bildung zahlreicher Artefakte führt, und das genuine Aglykon auf diese Weise nicht erhalten werden kann. Bei den Saponinen aus *P. veris* sind daher bis jetzt die genuinen Aglykone nicht identifiziert worden. Von den bisherigen Vorstellungen abweichend, zeigte sich bei unseren Untersuchungen, daß die Drogen beider Stammpflanzen die gleichen Hauptsaponine enthalten.

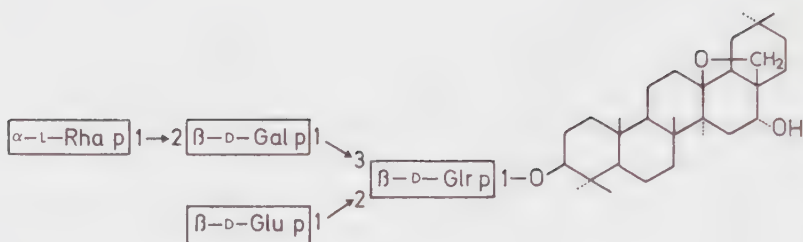
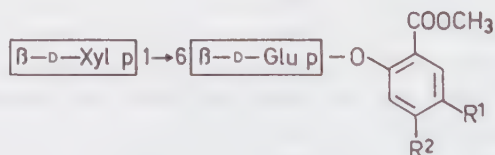


Abb.25: Hauptsaponin aus *Primulae radix*

2.2.2 Weitere Inhaltsstoffe

Weitere wichtige Inhaltsstoffe der Primelwurzel sind die Phenolglykoside **Primulaverin** und **Primverin** (Abb.26). Primulaverin leitet sich vom 5-Methoxysalicylsäuremethylester, Primverin vom 4-Methoxysalicylsäuremethylester ab. Beide enthalten 2-O-glykosidisch gebundene Primverose, ein Disaccharid aus Xylose und Glucose in 1->6-Verknüpfung (115). THIEME (115) fand in den unterirdischen Organen von *P. veris* und *P. elatior* nur Primulaverin. Wie später ausgeführt, waren von uns aber immer beide Verbindungen in den verschiedenen Primula-Wurzel-Chargen nachweisbar.



$R^2 = -OCH_3$, $R^1 = H$: Primulaverin
 $R^1 = H$, $R^2 = -OCH_3$: Primverin

Abb.26: Phenolglykoside aus *Primulae radix*

Das durch Wasserdampfdestillation gewonnene ätherische Öl enthält als Hauptbestandteile die Aglykone der Phenolglykoside und Spuren von Methylsalicylat (116). Diese Ester - besonders der sehr geruchsintensive 4-Methoxysalicylsäuremethylester - sind für den typischen Geruch frischer Primelwurzeln verantwortlich. In unseren Untersuchungen waren die Ester meist auch in Methanolextrakten nachweisbar.

Weiterhin wurden in Primelwurzeln seltene Zucker wie Hep-tosen, Octulosen und Nonulosen (117), sowie der Zuckeralkohol Volemitol (118) aufgefunden.

2.3 Pharmakologische Eigenschaften von Primulae Radix

Die Wurzeln von *P. veris* und *P. elatior* gehören zu den am häufigsten arzneilich verwendeten Saponindrogen. Wegen ihrer ausgesprochen expektorierenden Wirkung wird die Droge hauptsächlich bei Husten und Bronchitis, meist in Kombination mit andern Drogenextrakten oder zugesetzten Reinstoffen eingesetzt. Der Mechanismus der expektorierenden Wirkung beruht auf einer Verflüssigung des zähen, im hinteren Rachenraum befindlichen Schleims aufgrund der Oberflächenaktivität der Primulasaponine und möglicherweise auf der Reizung sensorischer Vagusendigungen in der Magenschleimhaut (19).

Primulasaponine besitzen eine stark anthelminthische Wirkung, wie sowohl in vitro als auch in klinischen Versuchen gezeigt wurde. Starke Nebenwirkungen (Erbrechen, Übelkeit) stehen jedoch der therapeutischen Anwendung entgegen (18).

Wie viele andere Saponine besitzen auch die Primulasaponine antimikrobielle Eigenschaften. Primulasaponin besitzt von allen getesteten Saponinen das breiteste Wirkungsspektrum gegen Bakterien und Pilze (11, 12).

Weiterhin zeigen die Primulasaponine eine antiexsudative

Wirkung am Ovalbuminödem der Rattenpfote, die mit der von β -Aescin vergleichbar ist (11).

2.4 Bisherige Bestimmungsmethoden für Primulasaponine

Die im DAB 7 und im ÖAB 9 noch vorgeschriebene Bestimmung des hämolytischen Index hat keine Aufnahme in das DAB 8 gefunden, da keine Korrelation der hämolytischen Aktivität von Saponinen mit der pharmakologischen Aktivität besteht. Neben der hämolytischen Wertbestimmung nach der Agardiffusionsmethode (85) finden sich in der Literatur photometrische Methoden nach papier- oder dünnschicht-chromatographischer Trennung der Saponine. NEUWALD und KLINGMÜLLER (121) eluieren die Saponinzone nach papierchromatographischer Trennung und schließen eine kolorimetrische Bestimmung nach Umsetzung mit Vanillin-Salzsäure- und Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz an. Bei der Methode von FRANCK (30) wird nach der DC-Trennung mit Nilblau-Reagenz detektiert, wobei die Saponine den Farbstoff entfärben. Anschließend wird eine Remissionsmessung durchgeführt. KARTNIG und Mitarb. bestimmten die DC-getrennten Saponine nach Umsetzung mit konzentrierter Schwefelsäure (119). SZILAGYI und KERNOCZY schlagen eine Methode vor, bei der aus den getrennten Saponinen durch Methanolyse mit Salzsäure eine Substanz mit einem Dien-Chromophor gebildet wird, die photometrisch bei 243 nm erfaßt wird (120). Eine Arbeit von PASICH zieht zur Bestimmung der Primulasaponine die Farbreaktion mit Kobaltchlorid/Eisessig bzw. Eisen-III-chlorid/Schwefelsäure heran (121). GLASL und IHRIG (31) führen nach der DC-Trennung der Primulasaponine und Detektion mit konzentrierter Schwefelsäure eine Remissionsmessung durch. Als Eichsubstanz dient wegen der gleichen Remissionsspektren β -Aescin.

2.5 HPLC-Analyse von Primula-Extrakten

2.5.1 Trennsystem und Probenvorbereitung

Aufgrund der bei der Aescin-Analyse gemachten Erfahrungen wählten wir für die HPLC-Analyse von Primulasaponinen ebenfalls ein Reversed-Phase-System (RP 18) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser-Gemischen mit Phosphorsäurezusatz. Die lineare Gradientenelution von 30 - 50.5% Acetonitril in 25 min erwies sich als am besten geeignet (TS 7). Der Säurezusatz verringert das Tailing der durch die Glucuronsäure sauer reagierenden Primulasaponine. Als besonders problematisch erwies sich die Detektion, da die Primulasaponine als Oleananderivate im Aglykon keine über 200 nm absorbierenden Strukturelemente aufweisen. Im Bereich von 190 - 200 nm absorbieren besonders die Ether- bzw. Acetalstrukturen des Zuckeranteils. Es mußte also bei möglichst niedriger Wellenlänge detektiert werden (unter 200 nm), um ausreichende Empfindlichkeit zu erzielen. Andererseits treten bei Wellenlängen unter 200 nm verstärkt Probleme durch Begleitstoffe und starken Grundlinienanstieg bei Gradientenelution auf. Als Kompromiß erwies sich eine Wellenlänge von 195 nm als geeignet. Eine Vorreinigung der Proben war auch im Falle der Primulasaponine notwendig. Wie unter 1.6.1 beschrieben, wurde eine Probenvorbereitung durch Filtration über RP-18-Material (Sep-Pak-Kartuschen) ausgearbeitet (siehe exp. Teil). Wenn der Trockenextrakt in 10%igem Methanol gelöst und hydrophile Begleitstoffe mit demselben Lösungsmittelgemisch eluiert wurden, traten keine Verluste an Saponinen auf.

Zur Überprüfung der Vorreinigung wurden die Extrakte, die fertigen Probenlösungen und die abgetrennte Lösung mit den hydrophilen Begleitstoffen dünnschichtchromatographisch (DC TS 1) untersucht (Abb.27).



Zuordnung:

- 1: Extrakt 1 nach der Probenvorbereitung
- 2: aus Extrakt 1 abgetr. Fraktion
- 3: Extrakt 2 nach der Probenvorbereitung
- 4: Rohextrakt 2

Det.: 1. UV 254 nm
2. Komarowsky-Reag.

LM: DC TS 1

[] UV 254 nm
///// blauviolett
xxxxx braun-grün

Abb.27: DC-Trennung von Primulae-radix-Extrakten vor und nach der Vorreinigung

Wie aus Abb.27 hervorgeht, waren in den Proben nach Detektion mit Komarowsky-Reagenz zum Teil zwei, zum Teil nur eine blauviolette Zone (a und c) nachweisbar. Hierbei handelt es sich um Saponine. Zone b besitzt eine etwas andere Färbung und reagiert im Gegensatz zu den Saponin-zonen nicht mit Nilblau-Reagenz. Diese Befunde entsprachen früheren Untersuchungen, bei denen ebenfalls nur eine oder zwei Saponinzonen nachgewiesen wurden (30, 31, 119, 120, 123). STAHL untersuchte authentisches Drogenmaterial von *P. veris* und *P. elatior* und stellte fest, daß bei beiden Stammpflanzen zwei hämolysierende Saponin-zonen mit übereinstimmenden Rf-Werten auftraten (137). In fast allen Extrakten war vor dem Besprühen eine fluoreszenzmindernde Zone (d) feststellbar, die im Verlauf der Untersuchungen als Gemisch aus Primulaverin und Prim-

verin erkannt wurde. Die Probenlösungen sind weitgehend von Substanzen mit $R_f < 0.3$ und > 0.7 befreit. Die abgetrennte hydrophile Fraktion enthält keine Saponine. Die Phenolglykoside (Zone d) sind jedoch teilweise miteluiert worden.

2.5.2 HPLC-Trennung von *Primulae-radix*-Extrakten

Abb.28 I-VII zeigt einige ausgewählte Chromatogramme verschiedener Drogen, Trockenextrakte und Fluidextrakte des Handels und eines Fertigarzneimittels. Die zugehörigen UV-Spektren wurden mit Hilfe der Photodiodenarray-Technik aufgenommen. Die Zuordnung wurde nach den im folgenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen vorgenommen. Bei dem mit S gekennzeichneten Peak handelt es sich um PHB-Propylester, der als innerer Standard für die quantitativen Bestimmungen zugesetzt wurde.

I: *Primulae radix* (Galke)

Neben den beiden Saponinen Primulasaponin 1 und 2 (c, a) enthält die Droge auch die freien Aglykone der Phenolglykoside Primulaverin und Primverin, nämlich 5- bzw. 4-Methoxysalicylsäuremethylester (b, d). Die mit x_{1-3} gekennzeichneten Peaks wurden nicht näher untersucht. Sie besitzen einander sehr ähnliche UV-Spektren, die auf ein aromatisches System ohne weitergehende Konjugation hindeuten. Durch die niedrige molare Extinktion der Primulasaponine erscheinen diese nur als relativ kleine Peaks, obwohl sie mengenmäßig die Hauptverbindungen darstellen.

II *P. elatior* (authentische Probe)

Die Droge wurde im Frühjahr 85 in Deutschland gesammelt und botanisch bestimmt. Sie enthält nur Primulasaponin 1 (c) und nur Spuren der phenolischen Verbindungen. Sub-

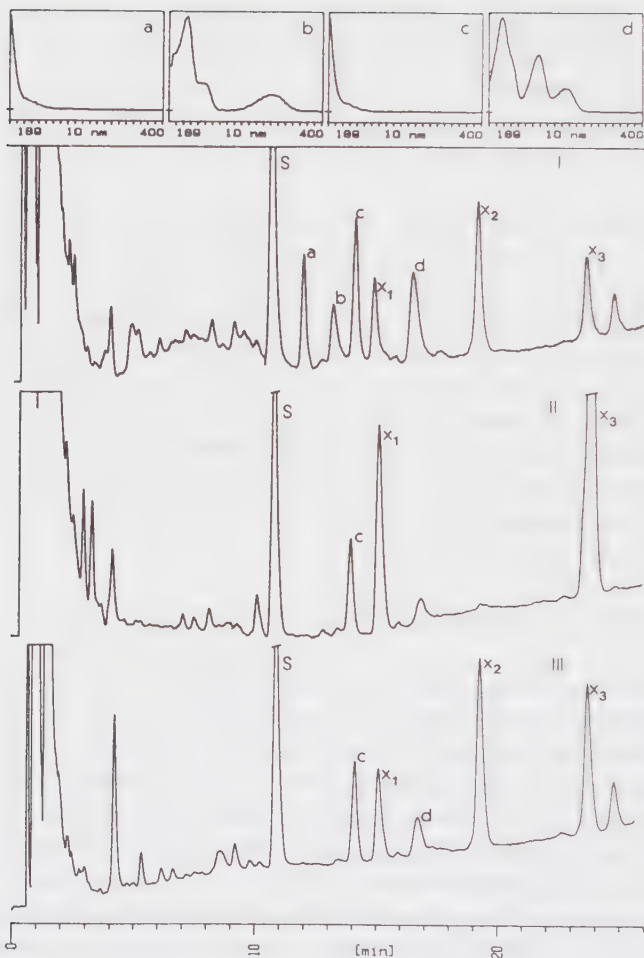


Abb.28: HPLC-Fingerprints (TS 7) von *Primulae-radix*-Drogen, -Extrakten und -Fluidextrakten, sowie eines Fertigarzneimittels. a = Primulasaponin 2, b = 5-Methoxysalicylsäuremethylester, c = Primulasaponin 1, d = 4-Methoxysalicylsäuremethylester, x₁₋₃ nicht identifiziert

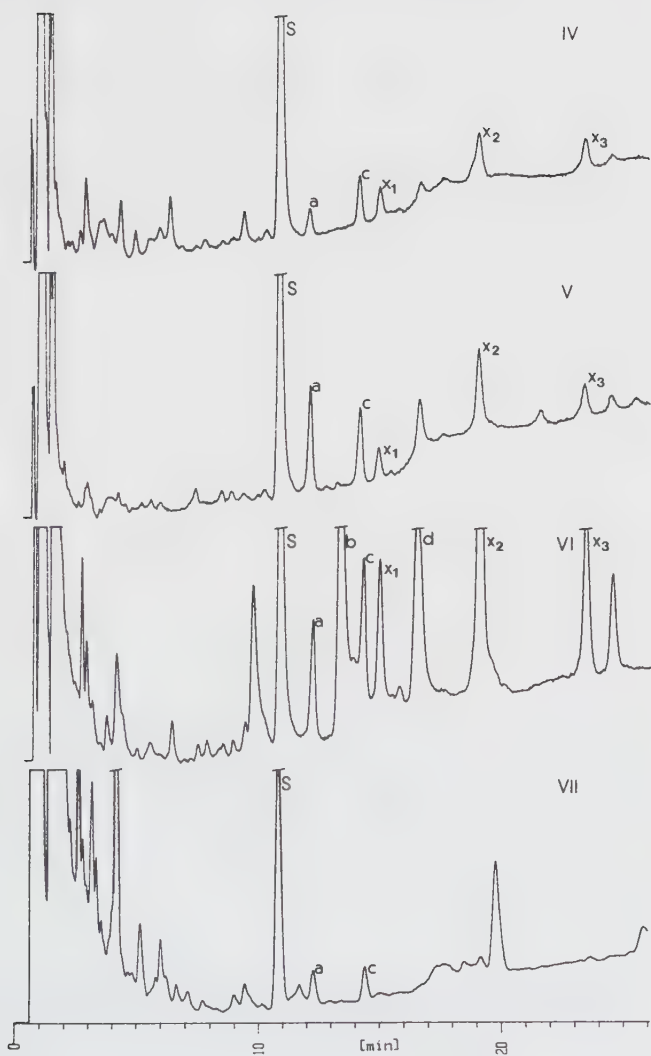


Abb. 28

stanz x_1 ist in relativ hoher Menge, x_2 dagegen überhaupt nicht nachweisbar.

III P. veris (authentische Probe)

Die Droge wurde ebenfalls im Frühjahr 85 gesammelt und bestimmt. Sie enthält ebenfalls nur Primulasaponin 1. Neben geringen Mengen an 4-Methoxysalicylsäuremethylester treten die Peaks x_{1-3} auf.

IV Trockenextrakt (Wasserextrakt, Birkenweg 865/5)

Der Extrakt enthält relativ geringe Mengen an beiden Saponinen, keine freien Ester.

V Trockenextrakt (Birkenweg 863/5)

Neben beiden Saponinen sind nur geringe Mengen der Substanzen x_{1-3} und keine Aglykone der Phenolglykoside enthalten.

VI Fluidextrakt (Birkenweg 864/5)

Auffällig ist der sehr hohe Gehalt an 5- und 4-Methoxysalicylsäuremethylester (b, d). Durch das Tailing dieser beiden Peaks verschlechtert sich die Trennung der beiden Saponine (a,c). Die Verbindungen x_{1-3} sind in relativ hoher Menge enthalten.

VII Expektysat Bürger^R

In diesem Fertigarzneimittel sind die beiden Primulasaponine 1 und 2 nachweisbar. Das Mittel enthält neben Preßsaft aus Radix Primulae noch große Mengen von Preßsäften aus Radix Violae und Herba Thymi (siehe exp. Teil). Durch die Vorreinigung werden störende Substanzen aus den ande-

ren Preßsäften offenbar weitgehend abgetrennt. Die Methode liefert von Extrakten, Fluidextrakten und Fertigarzneimitteln einen charakteristischen Fingerprint, der die eindeutige Identifizierung der Droge erlaubt. Das Beispiel des Fertigarzneimittels zeigt, daß die Saponin-komponenten auch in Gemischen aus mehreren Extrakten nachweisbar sind, wenn sie in genügender Konzentration enthalten sind und nicht durch Substanzen mit sehr ähnlicher Retentionszeit überlagert werden.

Nach unseren Ergebnissen und den von STAHL (137) durchgeführten DC-Untersuchungen kann als gesichert gelten, daß *P. veris* und *P. elatior* im Gegensatz zu früheren Vorstellungen (113) die gleichen Saponine (Primulasaponin 1 und 2) enthalten.

2.5.3 Temperaturabhängigkeit der Trennung

Bei der Durchführung der Analysen kam es in einigen Fällen zu veränderten Trennungen. Peak a (Saponin 2) überlagerte sich mit dem Standardpeak und machte so eine Auswertung unmöglich. In anderen Fällen waren Peak c und Peak d nicht mehr vollständig getrennt. Diese Veränderungen waren darauf zurückzuführen, daß die Trennungen bei etwas wechselnden Raumtemperaturen (18-25°C) durchgeführt wurden. Bei einer Temperatur von 22°C, die durch Temperieren der Säule in einem Wasserbad gehalten wurde, war die Trennung optimal und reproduzierbar. Bei leicht höherer Temperatur verlängerte sich die Retentionszeit der Saponine. Zur Untersuchung dieses auch schon bei β -Aescin beobachteten Retentionsverhaltens wurden Trennungen (TS 7) bei verschiedenen Temperaturen (0°-80°C) durchgeführt und die Retentionszeiten der Saponine und des Standardpeaks in einem Diagramm gegen die Temperatur aufgetragen (Abb.29).

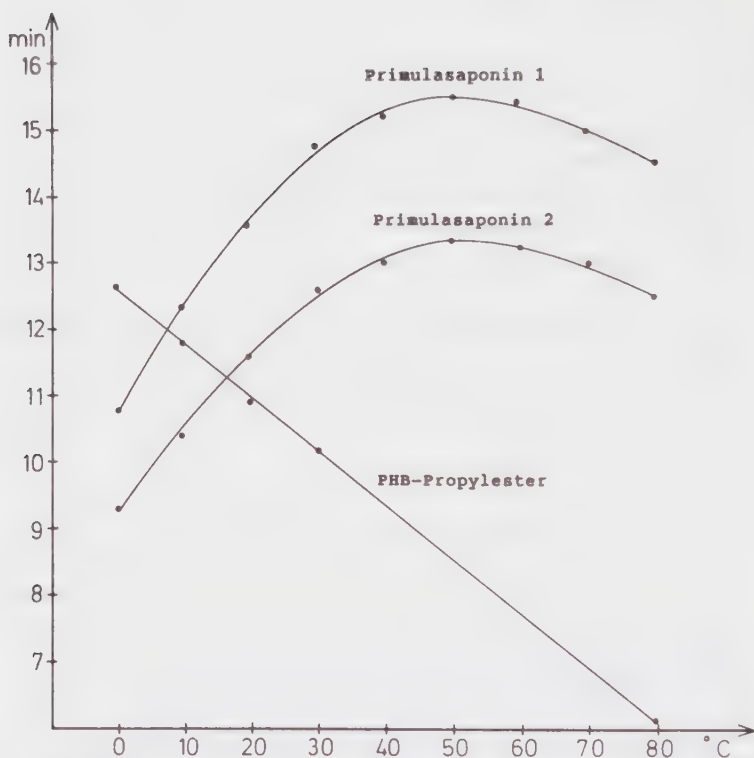


Abb.29: Temperaturabhängigkeit der Retentionszeiten der Primulasaponine (TS 7)

Die Retentionszeit des Standards weist eine lineare, umgekehrt proportionale Abhängigkeit von der Temperatur auf, was dem üblichen Verhalten entspricht (96). Die Retentionszeit der Saponine steigt mit zunehmender Temperatur zunächst an, erreicht bei etwa 50°C (vgl. Aescin) ein Maximum und nimmt bei weiterer Temperaturerhöhung ab. Aus dem Diagramm läßt sich direkt ablesen, bei welcher

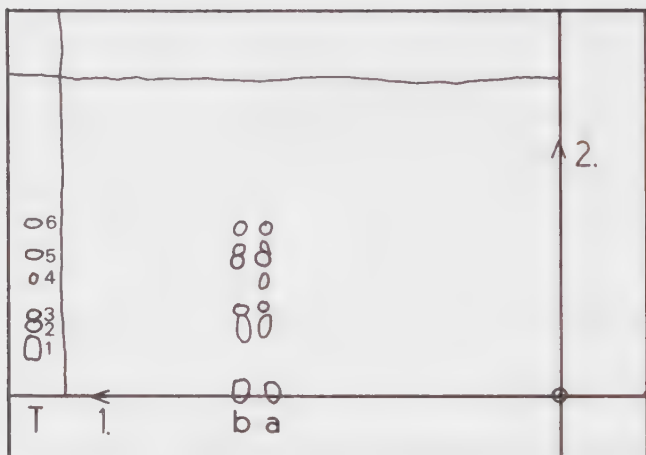
Temperatur sich Saponinpeaks und Standard (PHB-Propylester) überlagern. Bei 17°C besitzen Saponin 2 und der Standardpeak gleiche Retentionszeit. Bei Temperaturen zwischen 8 und 17°C liegt der Standardpeak zwischen den Saponinen. Dieses Art der Temperaturabhängigkeit des Retentionsverhaltens scheint eine für Saponine typische Eigenschaft zu sein.

2.6 Isolierung und Identifizierung der Primulasaponine

2.6.1 Vorversuche

Zur eindeutigen Identifizierung der nach Detektion mit Komarowsky-Reagenz blauvioletten Saponinzonen wurde eine Mikrohydrolyse in Verbindung mit zweidimensionaler DC (97) durchgeführt. Dazu wurde auf eine HPTLC-Platte im rechten unteren Eck ein mit Sep-Pak vorgereinigter Primula-Extrakt punktförmig aufgetragen und entwickelt (DC TS 1). Nach dem Trocknen wurde die Platte heißen Salzsäuredämpfen ausgesetzt und in um 90° gedrehter Richtung im Zuckerlaufmittel (DC TS 2) ein zweites Mal entwickelt (Abb.30).

Aus Abb.30 geht hervor, daß bei der Hydrolyse aus den beiden Hauptzonen (a, b) einige Zucker abgespalten wurden. Es konnten in beiden Zonen Glucuronsäure bzw. ihr Lacton und Rhamnose eindeutig nachgewiesen werden. Auf der Höhe von Glucose befanden sich bei beiden Saponinen Zonen, die aber nicht eindeutig der Glucose oder Galaktose zugeordnet werden konnten. Zone a zeigte eine zusätzliche Abspaltung eines Zuckers, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um Xylose handelte. Damit war der Glykosidcharakter der beiden Zonen gesichert.



Zuordnung:

T: Testgemisch

- 1 Glucuronsäure
- 2 Galaktose
- 3 Glucose
- 4 Xylose
- 5 Rhamnose
- 6 Glucuronsäurelacton

Det.: Diphenylaminophosphorsäure-Reagenz

LM: 1. DC TS 1
2. DC TS 2

Abb.30: Zweidimensionale DC mit Mikrohydrolyse eines vor-gereinigten Primula-Extraktes

2.6.2 Isolierung von Primulasaponin 1 und 2 (s.exp.Teil)

Wir wählten einen Extrakt, der beide Saponine in hoher Menge enthielt und bei dem die Zone zwischen den Saponin-zonen (Zone b in Abb.27) sehr schwach ausgeprägt war. Die Isolierung erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurde der Extrakt über Sep-Pak- C_{18} -Kartuschen wie bei der HPLC-

Probenvorbereitung aufbereitet. Es resultierte eine leicht gelbliche klare Lösung. Diese wurde portionsweise auf Kieselgel-Platten (0.5 mm) aufgetragen und im Laufmittel DC TS 1 entwickelt. Die Detektion erfolgte durch Besprühen eines schmalen Randstreifens mit Komarowsky-Reagenz. Nach Trocknen, Auskratzen, Elution mit Methanol und Einrotieren, wurde ein weiteres Mal über Sep-Pak in der beschriebenen Weise gereinigt. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Arbeitsganges erhielten wir ca. 20 mg Saponin 1 und 15 mg Saponin 2 in reiner Form.

2.6.3 Strukturelle Untersuchungen an Saponin 1 und 2

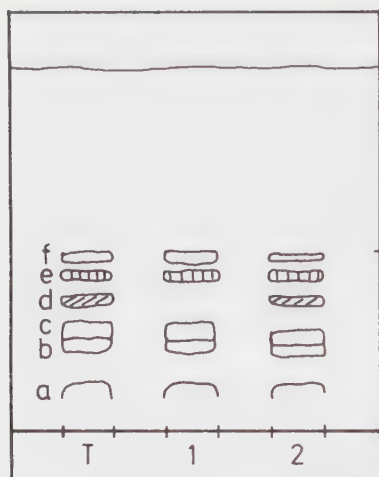
Für die Untersuchungen kamen DC-, GC- und MS-Methoden sowie die GC-MS-Analyse zum Einsatz.

2.6.3.1 DC-Untersuchungen

Beide Saponine wurden auf verschiedene Arten hydrolysiert und die Spaltprodukte dünnschichtchromatographisch untersucht.

Zur Analyse der Zucker wurde wiederum eine Mikrohydrolyse auf der DC-Platte (97) durchgeführt. Nach HCl-Bedampfung und Entwicklung im Laufmittel DC TS 2 ergab sich das in Abb.31 dargestellte Bild.

Saponin 1 und 2 lieferten auf der Höhe von Glucuronsäure (bzw. ihres Lactons), Rhamnose und Glucose bzw. Galaktose deutliche Zonen. Eine Entscheidung, ob jeweils nur Galaktose oder Glucose oder beide vorlagen, war nicht eindeutig möglich. Saponin 2 zeigte zusätzlich auf der Höhe der Xylose eine Zone.



Zuordnung:

- T: Testgemisch
a Glucuronsäure
b Galaktose
c Glucose
d Xylose
e Rhamnose
f Glucuronsäurelacton
1: Primulasaponin 1
2: Primulasaponin 2

Det.: Diphenylaminophosphorsäure-Reagenz

LM: DC TS 2

///// grau [] blau ||||| grün

Abb.31: Mikrohydrolyse von Primulasaponin 1 und 2

Nach Hydrolyse mit HCl-Dampf auf der DC-Platte, sowie nach zweistündiger Hydrolyse mit 2N Trifluoressigsäure bzw. enzymatischer Hydrolyse mit Enzymsuspension aus *Helix pomatia* und anschließender Ausschüttelung der lipophilen Hydrolyseprodukte mit Dichlormethan wurde im System DC TS 4 entwickelt (Abb.32).

Nach den Säurehydrolysen ist eine Vielzahl von Zonen zu erkennen, von denen eine ($R_f = 0.4$) die Hauptzone bildet. Bei der enzymatischen Hydrolyse entsteht in sehr geringer Ausbeute nur ein Produkt. Bei allen drei Hydrolysemethoden ist das entstehende Produktmuster bei Saponin 1 und 2 exakt gleich. Daraus ist zu folgern, daß beide Saponine das gleiche Aglykon besitzen. Es war also anzunehmen, daß es sich bei Saponin 1 um das von TSCHESCHE, WAGNER und WIDERA (112) isolierte und aufgeklärte

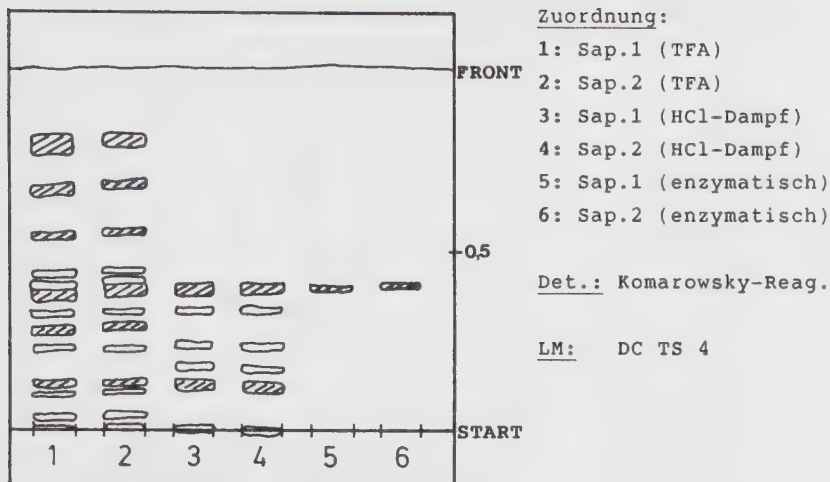


Abb.32: DC-Trennung der Hydrolyseprodukte von Primula-saponin 1 und 2 im Aglykonlaufmittel DC TS 4

Hauptsaponin und bei Saponin 2 um ein noch nicht beschriebenes xylosehaltiges Saponin handelte.

2.6.3.2 GC-Untersuchungen der Zuckeranteile

Zur qualitativen und quantitativen Absicherung wurden die durch Hydrolyse mit 2N Trifluoressigsäure freigesetzten Zucker in die Alditolacetate (124) (s. exp. Teil) überführt und gaschromatographisch bestimmt.

Wie Abb.33 zeigt, wurde im Alditolacetatgemisch von Saponin 1 Rhamnose, Galaktose und Glucose (im Verhältnis 1 : 1 : 0.9) und in Saponin 2 Rhamnose, Xylose, Galaktose und Glucose (1 : 0.8 : 1: 0.8) durch Vergleich mit einem Alditolacetat-Testgemisch identifiziert. Die Glucuronsäure wurde wie erwartet nicht reduziert. Damit war bewiesen, daß beide Saponine Galaktose und Glucose enthielten und daß jeweils nur 1 Mol jedes Zuckers im Saponin

enthalten ist. Saponin 1 war demnach ein Tetraglykosid, Saponin 2 ein xylosehaltiges Pentaglykosid.

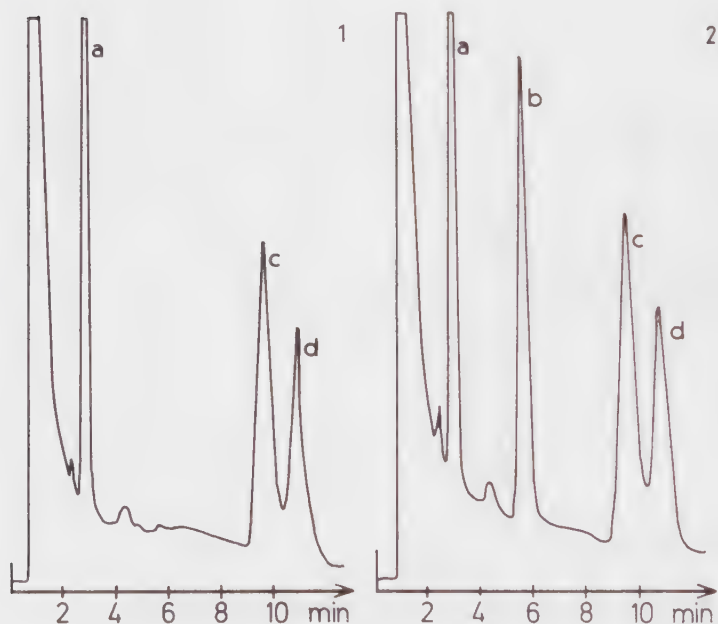


Abb.33: GC-Trennung der Alditolacetate von Primulasaponin 1 und 2, a = Rhamnose, b = Xylose, c = Galaktose d = Glucose

2.6.3.3 FAB-MS von Saponin 1 und 2

Um Informationen über das Molekulargewicht der Saponine, die Zuckersequenz, sowie über das Aglykon zu erhalten, führten wir eine FAB-massenspektrometrische Untersuchung der beiden Saponine durch (Abb.34). Es wurden die negativen Ionen registriert.

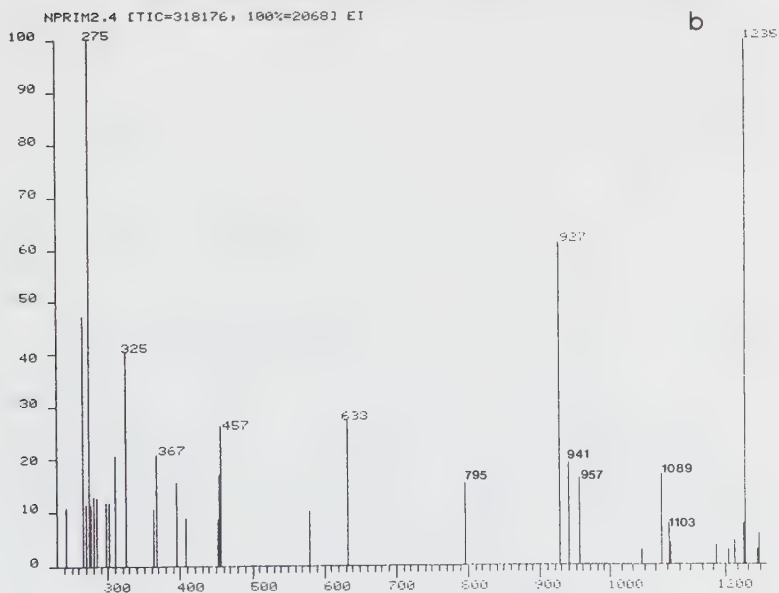
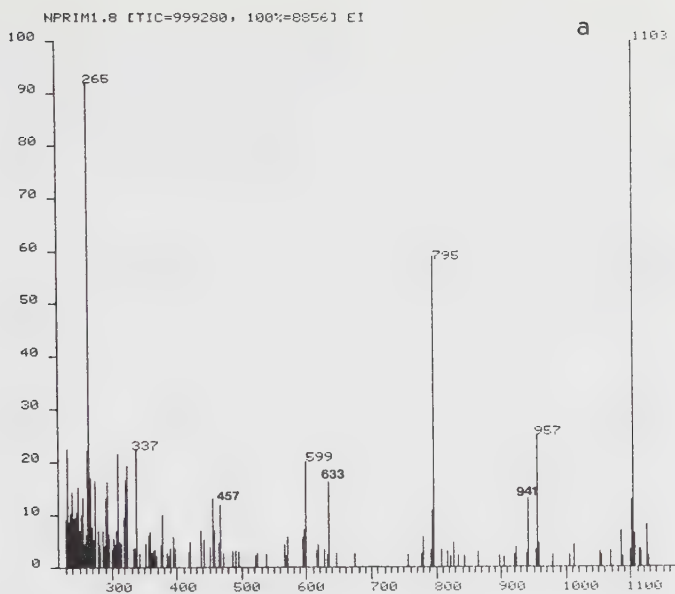
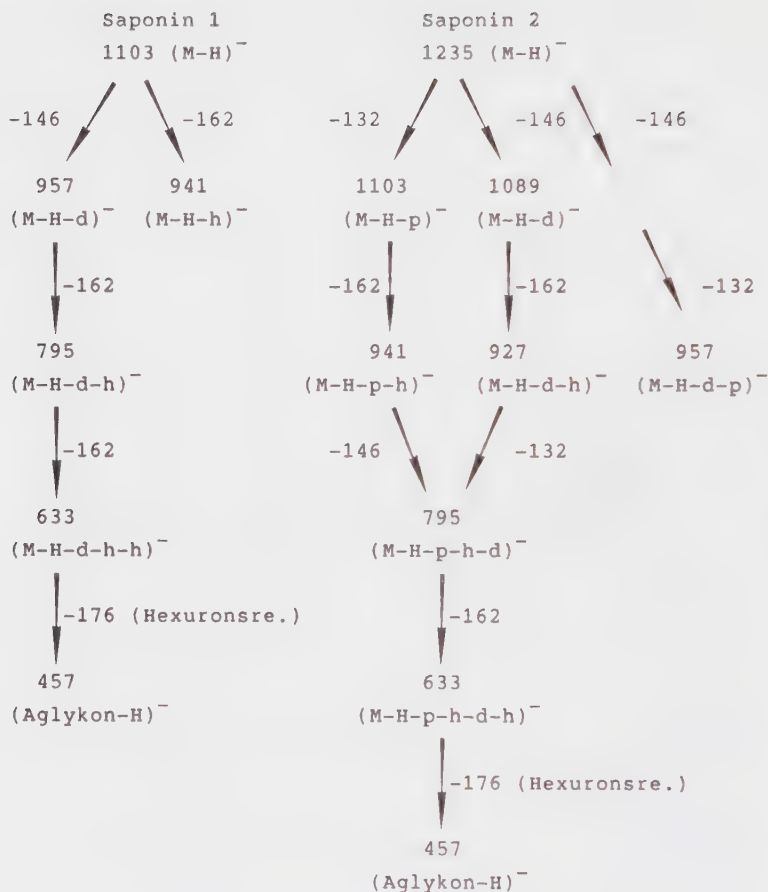


Abb. 34



h = Hexose p = Pentose d = Desoxyhexose

Abb.34: FAB-Massenspektrum von Primulasaponin 1 (a) und 2 (b) mit Zuordnung

Saponin 1 besitzt ein Molgewicht von 1104, Saponin 2 von 1236. Rechnerisch ergibt sich für das Aglykon beider Saponine ein Molekulargewicht von je 458, was durch die Spektren auch bestätigt wird. Ein Molekulargewicht von 458 ($C_{30}H_{50}O_3$) besitzen nur sehr wenige bekannte Triterpenaglykone (1, 4). Das hier vorliegende Aglykon ist außerdem ein Oleananderivat, wie aus den UV-Spektren hervorgeht. Protoprimulagenin A ist das einzige bekannte Triterpenaglykon, auf das diese Daten zutreffen. Für die Struktur der Zuckerkette ergaben sich folgende Hinweise:

Saponin 1: Die Abspaltung von zwei verschiedenen Monosaccharideinheiten aus dem $M-H$ spricht für das Vorliegen einer verzweigten Zuckerkette. Als endständige Zucker liegen eine Desoxyhexose, also Rhamnose, und eine Hexose (Glucose oder Galaktose) vor. Das Ion bei $m/e = 633$ stellt das Aglykon mit einer daran gebundenen Hexuronsäure dar.

Saponin 2: Es liegt ebenfalls eine verzweigte Zuckerkette vor. Die endständigen Zucker sind Rhamnose und Xylose. Da sich aus beiden, um einen endständigen Zucker ärmeren Fragmenten (m/e 1103 und 1089) jeweils eine Hexose abspalten kann, müssen sowohl Xylose als auch Rhamnose direkt mit einer Hexose verknüpft sein. Die Hexosen können also untereinander nicht verknüpft sein.

Nach diesen Befunden und dem für ein Oleanan sprechenden UV-Spektren liegt mit Saponin 1 das früher aus *P. elatior* isolierte Hauptsaponin (112) vor.

Das von uns erstmals isolierte Saponin 2 enthält nach dem FAB-MS und den Hydrolyseversuchen das gleiche Aglykon (Protoprimulagenin A). Der Zuckeranteil setzt sich laut FAB-MS folgendermaßen zusammen:



Zur weiteren Absicherung der Struktur von Saponin 2 wurde die Zuckersequenz und -verknüpfung untersucht und eine MS-Analyse des Permethylsaponins vorgenommen.

2.6.3.4 Bestimmung der Zuckersequenz und -verknüpfung in Saponin 2 (125)

Das Saponin wurde zuerst nach der für Polysaccharide, Oligosaccharide und auch Saponine am besten geeigneten Methode von HAKOMORI (126) permethyliert. Die Probe wurde in Dimethylsulfoxid gelöst und nach der Reaktion mit dem als Base eingesetzten Natrium-methyl-sulfinylmethanid mit Methyljodid umgesetzt. Anschließend wurde das Permethylsaponin mit Trifluoressigsäure hydrolysiert. Nach Reduktion der partiell methylierten Zucker mit Natriumborodeuterid (NaBD_4) zu den Alditolen wurde das Gemisch acetyliert und die Komponenten mit Hilfe der GC-MS-Analyse identifiziert (127). Durch die Reduktion mit NaBD_4 wird jeweils das C-1 (bzw. C-1 und C-6 bei Glucuronsäure) markiert. Dadurch ist eine eindeutige Zuordnung der Verknüpfung möglich.

Tab.16: Zuordnung der bei der GC-MS-Analyse identifizierten Peaks
(Säule OV 225, 150°, 3 min, dann 5°/min bis 210°)

Rt (min)	deuterierte partiell methylierte Alditolacetate
8.2	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-6-desoxy-hexitol-d1
9.2	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-pentitol-d1
15.3	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl-hexitol-d1
15.5	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-hexitol-d1
25.9	1,2,3,5,6-Penta-O-acetyl-4-O-methyl-hexitol-d3

PRIMAL.181 [TIC=40826880, 100%=2516992] EI

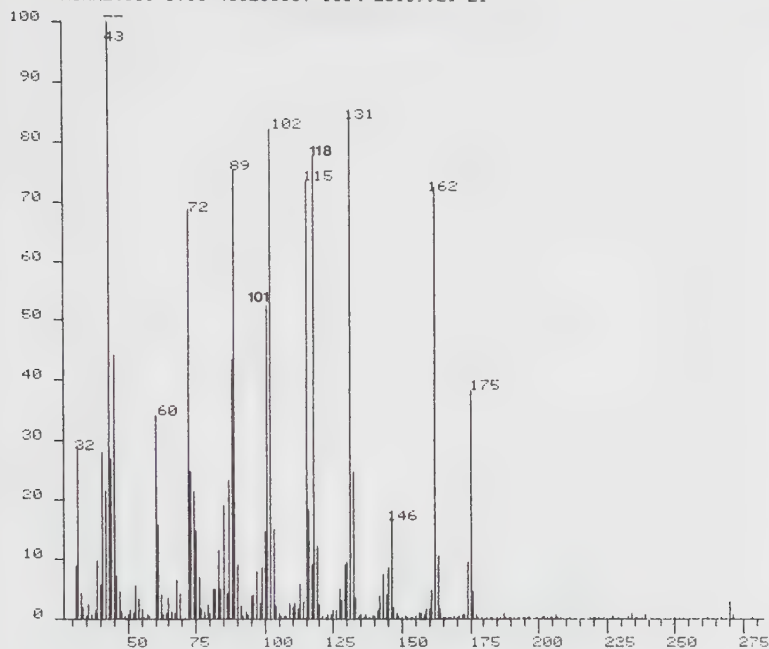
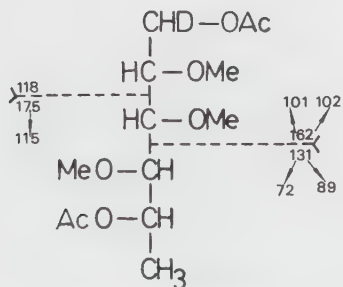


Abb.35 a



1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-6-desoxy-hexitol-d₁

⇒ Rhamnose 1→

Abb.35 a-e: MS und Fragmentierung der partiell methylierten Alditolacetate von Primulasaponin 2

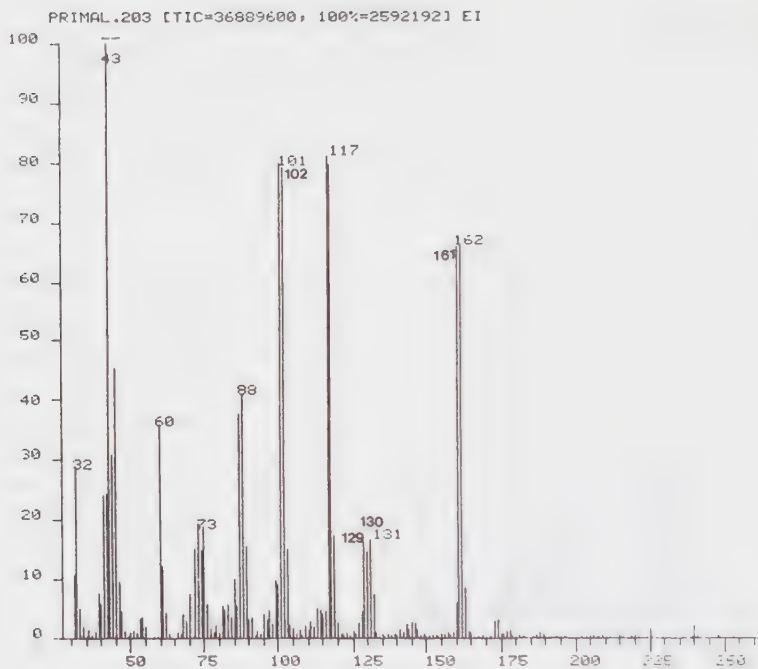
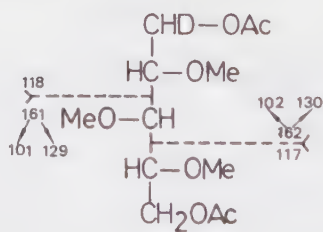


Abb.35 b



1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-pentitol-d₁

→ Xylose 1→

PRIMAL.422 [TIC=27604992, 100%=2043648] EI

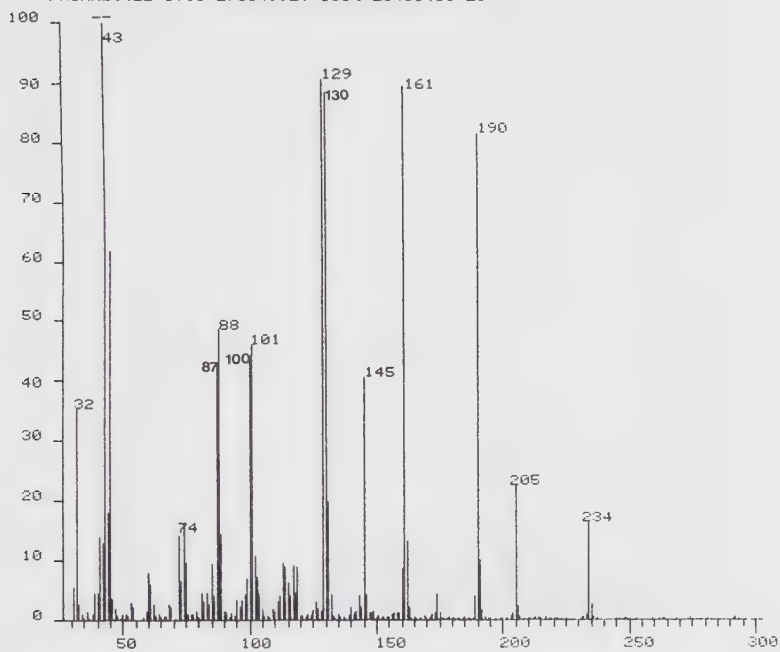
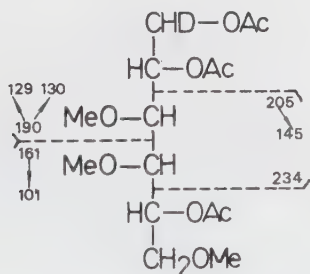


Abb.35 c



1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl-hexitol-d₁

⇒ →2 Galaktose 1→

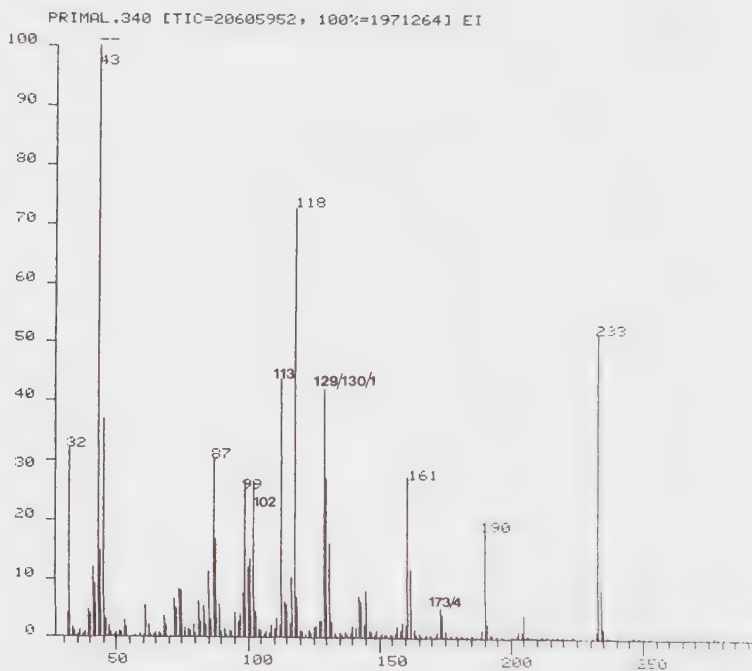
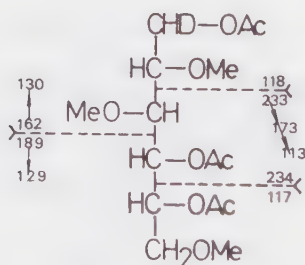


Abb.35 d



1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-hexitol-d₁

→ →4 Glucose 1→

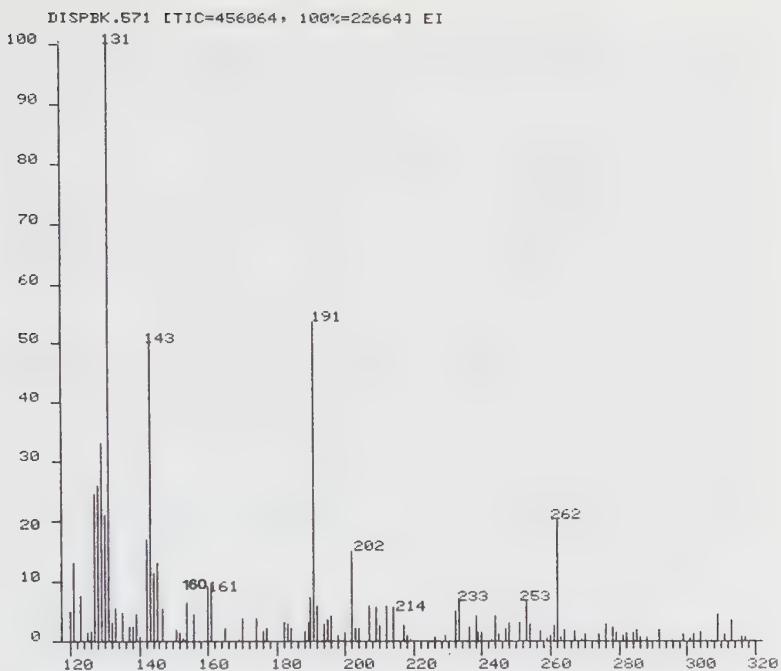
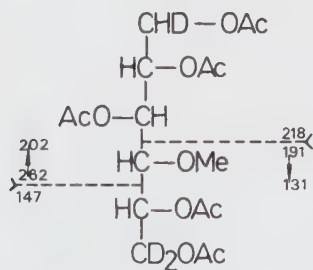


Abb.35 e



1,2,3,5,6-Penta-O-acetyl-4-O-methyl-hexitol- d_3

$\rightarrow 3$
 $\Rightarrow$ Glucuronsäure $1 \rightarrow$
 $\rightarrow 2$

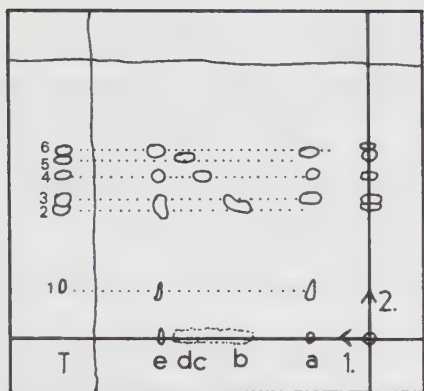
Durch Vergleich der MS-Spektren und des Retentionsverhaltens mit Literaturdaten, sowie durch Anwendung allgemeiner Fragmentierungsregeln (127, 128) konnten die fünf Zucker von Saponin 2 zugeordnet werden.

Als endständige Zucker wurden Rhamnose und Xylose identifiziert. Glucose lag in 1→4-Verknüpfung, Galaktose in 1→2-Verknüpfung vor. Glucuronsäure weist 1,2,3-Verknüpfung aus, d.h. sie ist die Verzweigungsstelle der Zuckerkette. Alle Zucker lagen in Pyranoseform vor.

Die Deuterierung ermöglichte eine Unterscheidung zwischen 1,2,3- und 1,2,4-substituierter Glucuronsäure. Ohne Deuterierung treten bei beiden Verbindungen aus Symmetriegründen die gleichen Massenfragmente auf (128). In unserem Falle traten Fragmente mit m/e 262 (C-1: 1D) und m/e 191 (C-6: 2D) auf, woraus eine 1,2,3-Substitution abzuleiten war. Bei 1,2,4-Substitution wären Fragmente von m/e 263 (C-6: 2D) und m/e 190 (C-1: 1D) aufgetreten. Die genaue Struktur des Zuckeranteils war jedoch noch nicht zu entscheiden, da nicht bekannt war, welcher der endständigen Zucker mit welcher Hexose verknüpft war (Rha-Gal oder Rha-Glu bzw. Xyl-Gal oder Xyl-Glu). Diese Frage versuchten wir durch Partialhydrolyse des Saponins zu klären.

2.6.3.5 Partialhydrolyse

Ziel war es, ein Disaccharid oder Trisaccharid selektiv abzuspalten. Nach einigen Hydrolyseversuchen mit verschieden starken Säuren und unterschiedlicher Dauer konnten wir mit 0.5N Trifluoressigsäure (30 min Dampfbad) ein Partialhydrolysat gewinnen, das nach der DC-Trennung (DC TS 2), Bedampfung mit HCl-Dampf zur Totalhydrolyse und nochmaliger Entwicklung (DC TS 2) das in Abb.36 gezeigte Dünnschichtchromatogramm lieferte.



Zuordnung:

T: Testgemisch

6 Glucuronsäurelacton

5 Rhamnose

4 Xylose

3 Glucose

2 Galaktose

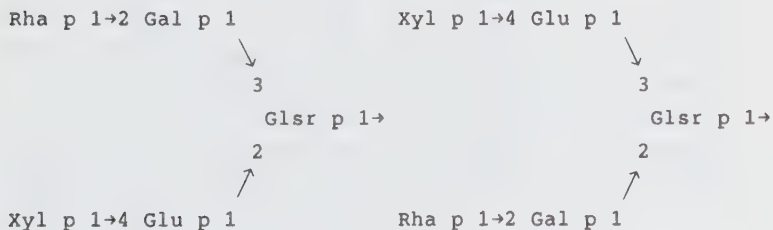
1 Glucuronsäure

Det.: Diphenylaminophosphorsäure-Reagenz

LM: 1. und 2. DC TS 2

Abb.36: DC-Untersuchung des Partialhydrolysats von Saponin 2

Aus der Zone a spaltete sich bei der Totalhydrolyse Glucuronsäure (bzw. ihr Lacton), Glucose und Xylose ab. Aufgrund des niedrigen Rf-Werts von 0.2 handelt es sich hierbei wahrscheinlich um ein Trisaccharid. Bei den Zonen b, c und d handelt es sich offensichtlich bereits um Monosaccharide. Zone e stellt evtl. ein zuckerärmeres Saponin (Glu/Xyl/Glsr) dar. Damit war gezeigt, daß Glucose und Xylose miteinander verbunden sind. Für den Zuckeranteil von Saponin 2 ergaben sich somit folgende mögliche Strukturen:



Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten ist nur durch Gewinnung eines entsprechenden Trisaccharids (oder eines um ein Disaccharid ärmeren Saponins) und anschließender Analyse mit spektroskopischen Methoden (MS, NMR) zu treffen. Dieses Vorgehen erfordert große Mengen an Saponin und die Reinisolierung des entsprechenden Produkts aus dem komplexen Hydrolysegemisch.

2.6.3.6 Massenspektrometrie von permethyliertem Saponin 2

Um die Struktur des Aglykons zu sichern, führten wir eine MS-Untersuchung des permethylierten Saponins durch. In der Literatur finden sich Arbeiten über die EI-MS-Analyse von peracetylierten (129), trimethylsilylierten (130, 131) sowie permethylierten Saponinen (132). Besonders die letztgenannte Methode wurde schon an einigen Saponinen erfolgreich durchgeführt (132, 106). Die Analyse läßt Schlüsse über die Zahl der freien OH-Gruppen des Aglykons, die Bindungsstelle der Zuckerkette, sowie teilweise über die Zuckerkomponenten selbst zu. Die Permethylierung erfolgte wie bei der Methylierungsanalyse nach HAKOMORI (126).

Tab.17: Zuordnung der Fragmentionen aus dem Aglykon

m/e	Zuordnung
470	Aglykon (1 x O-Methyl)
440	Aglykon - 30 (CH ₂ O)
410	Aglykon - 30 (CH ₂ O) - 31 (CH ₃ O)
379	Pentose → Hexose (permethyliert)
263	Retro-Diels-Alder-Fragment A
217	Aglykon - 31 (CH ₃ O) - 15 (CH ₃)
190	Retro-Diels-Alder-Fragment B - 17 (OH)

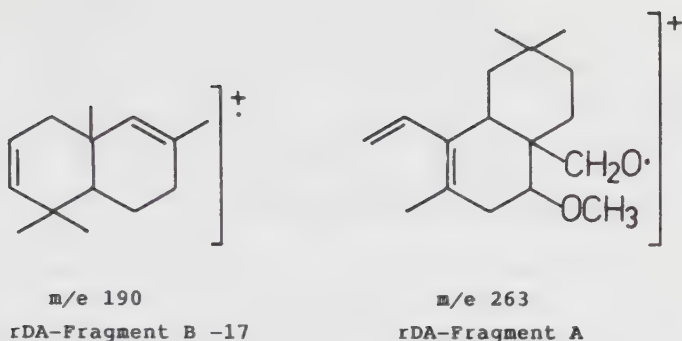


Abb.37: rDA-Fragmente von permethyliertem Primulasaponin 2

Aus Tab.17 geht hervor, daß das Aglykon nur eine methylierte OH-Gruppe trägt. Da an die eine OH-Gruppe die Zuckerkette gebunden ist, muß die dritte Sauerstofffunktion in einer der Permethylierung nicht zugänglicher Form, in diesem Fall als cyclischer Ether (13 β -28), vorliegen. Diese Etherbrücke öffnet sich bei der Elektronenstoßionisierung, so daß es zur Ausbildung einer $\Delta^{13,2}$ -Doppelbindung und einer $-\text{CH}_2-\text{O}-$ -Gruppe an C-17 kommt (vgl. 113). Danach kann die für Triterpene typische Retro-Diels-Alder(rDA)-Fragmentierung stattfinden. Abb.37 zeigt rDA-Fragment A (m/e 263) und das aus Fragment B entstandene Produkt (m/e 190). Das eigentliche Fragment B (m/e 207) tritt bei Permethylsaponinen nicht auf (132). Aus der rDA-Fragmentierung geht hervor, daß die Zuckerkette an der 3-OH-Gruppe gebunden sein muß.

Die Peaks m/e 470, 263, 217 und 203 waren jeweils von um zwei Masseneinheiten höheren Signalen begleitet, was evtl. auf thermische Reaktionen im Massenspektrometer zurückzuführen ist. Außer den in Tab.17 aufgeführten waren keine Zuckerfragmente eindeutig zuzuordnen. Ein Molekülpeak war nicht zu beobachten.

Mit den in den Punkten 2.6.3.1 - 2.6.3.6 gewonnenen Er-

kenntnissen kann die Struktur von Primulasaponin 2 als Protoprimulagenin-A-pentaglykosid mit der in 2.6.3.5 aufgestellten Zuckersequenz als ausreichend gesichert gelten.

2.7 HPLC-Analyse der Phenolglykoside

Um einen zusätzlichen Fingerprint für die Droge zu erstellen und evtl. eine Unterscheidung zwischen den heißen zulässigen Stammpflanzen zu ermöglichen, wurden auch die Phenolglykoside Primulaverin und Primverin in die HPLC-Analyse miteinbezogen.

2.7.1 HPLC-Trennung

Die Trennung erfolgte auf einer RP-₁₈-Phase mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten von 10 - 25% Acetonitril in 10 min unter Phosphorsäurezusatz (TS 8). Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 240 nm.

Abb.38 zeigt ein typisches Chromatogramm der Phenolglykosidtrennung eines *Primulae-radix*-Extraktes mit den zugehörigen UV-Spektren. In allen Proben war Primverin enthalten, in den meisten auch Primulaverin. Das durch Peakflächenauswertung unter Berücksichtigung der verschiedenen Extinktionskoeffizienten ermittelte Mengenverhältnis von Primulaverin zu Primverin lag in den untersuchten Proben in der Regel zwischen 10 : 1 und 0.2 : 1. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Angaben von THIEME und WINKLER (115), die in den Wurzeln von *P. veris* und *P. elatior* kein Primverin nachweisen konnten.

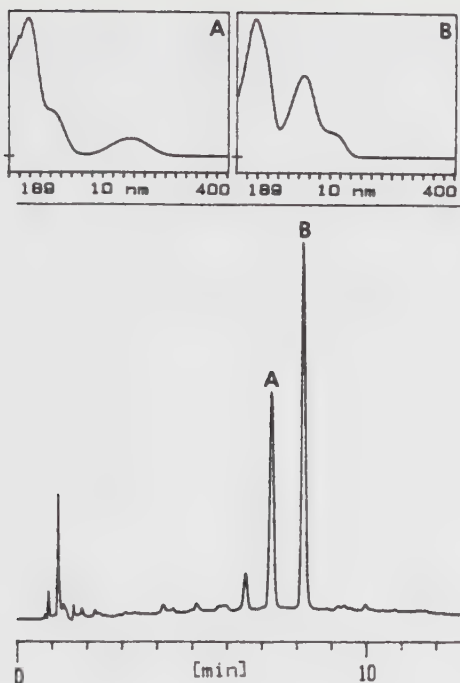


Abb.38: HPLC-Trennung (TS 8) der Phenolglykoside mit ihren UV-Spektren, A Primulaverin, B Primverin

2.7.2 Identifizierung der Phenolglykoside

Primulaverin stand als Vergleichssubstanz zur Verfügung. Peak A konnte durch Vergleich des Retentionsverhaltens und Co-Chromatographie bei der HPLC-Trennung sowie anhand des UV-Spektrums als Primulaverin identifiziert werden. Da Primverin nicht verfügbar war, wurde es im Mikromaßstab isoliert. Dazu wurde fein gepulverte Droge mit Ethanol extrahiert, der Extrakt in Wasser gelöst und mit Polyamid geschüttelt. Nach Filtration wurde mit Butanol/Ethylacetat ausgeschüttelt (s. exp. Teil). Die angerei-

cherte Fraktion wurde mittels semipräparativer HPLC (TS 9) getrennt. Wir erhielten ca. 0.5 mg eines öligen Produkts, das nach zwei Tagen in Nadeln kristallisierte. Die Substanz wurde für DC- und MS-Untersuchungen verwendet.

2.7.2.1 DC und Mikrohydrolyse der isolierten Substanz

Abb.39 zeigt die DC-Trennung von Primulaverin, der isolierten Substanz und eines Primula-Extraktes.

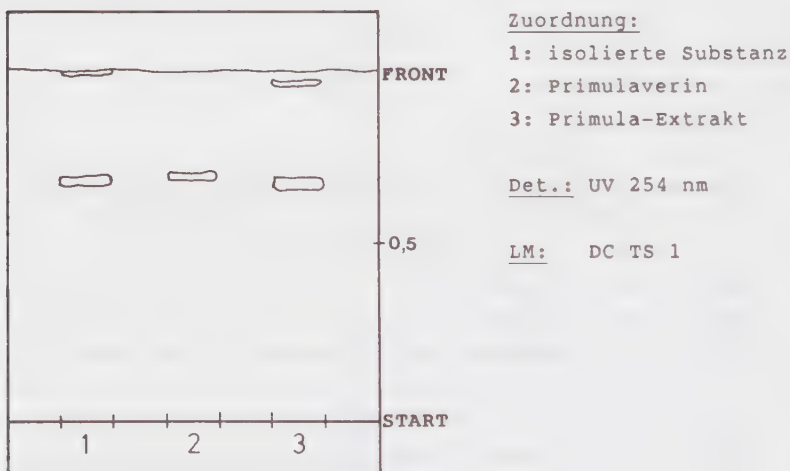


Abb.39: DC-Trennung der Phenolglykoside

Da beide Substanzen sehr ähnliche Rf-Werte (ca. 0.7) haben, ist eine Zuordnung im Primulaextrakt nicht möglich. Die Mikrohydrolyse nach KARTNIG (97) ergab für die isolierte Verbindung als Zuckerbausteine (DC TS 2) Xylose und Glucose. Entwicklung im Aglykonlaufmittel (DC TS 5)

ergab Identität des Aglykons mit 4-Methoxysalicylsäure-methylester, der von uns aus der entsprechenden Säure selbst hergestellt worden war (133).

2.7.2.2 FAB-MS der isolierten Substanz (s. exp. Teil)

Bei Positivionendetektion und Lithiumchlorid-Zusatz zeigte sich neben dem Pseudomolekülion $483 (M+Li)^+$ die Abspaltung einer endständigen Xylose (m/e 440, $M+Li-Xyl$) sowie die Aglykonfragmente 183 ($M+2H-Xyl-Glu$) und 151 ($M+2H-Xyl-Glu-CH_3OH$). Damit war die Identität der isolierten Substanz (Peak B, Abb.38) bewiesen.

2.8 Quantitative Untersuchungen

2.8.1 Gehaltsbestimmung der Primulasaponine

Die quantitative Bestimmung der Primulasaponine erfolgte im HPLC-Trennsystem TS 7 nach der Methode des inneren Standards. Als Standardsubstanz diente p-Hydroxybenzoesäurepropylester, der den Extrakten vor der Vorreinigung über Sep-Pak zugesetzt wurde, um eventuell auftretende Verluste auszugleichen (s. exp. Teil).

2.8.1.1 Standardkorrekturfaktor, Eichgerade, Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenzen (s. auch exp. Teil)

Als Eichgemisch diente eine Mischung der beiden Primulasaponine und dem inneren Standard. Zur Ermittlung der Standardkorrekturfaktoren wurde mehrmals die gleiche Menge an Eichlösung eingespritzt und der Mittelwert der Peakflächen zur Berechnung herangezogen.

$$f(\text{Primulasaponin 1}) = 5.0774 \cdot 10^{-3}$$

$$f(\text{Primulasaponin 2}) = 4.8360 \cdot 10^{-3}$$

Um zu überprüfen, in welchen Bereichen lineare Abhängigkeit zwischen der eingespritzten Menge und der Peakfläche besteht, wurden durch Einspritzen verschiedener Mengen der Eichlösung Eichgeraden erstellt (Abb.40).

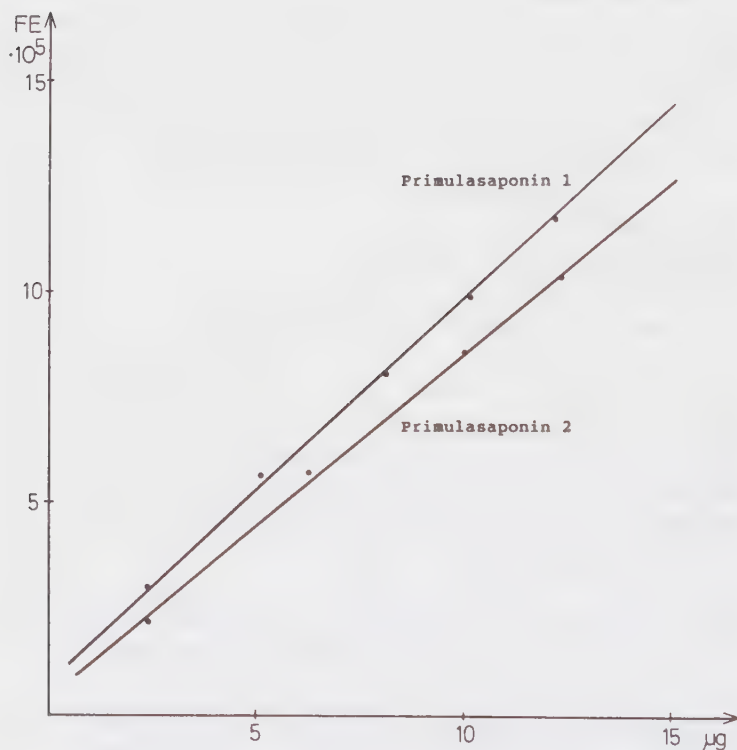


Abb.40: Eichgeraden der Primulasaponine 1 und 2

Abb.40 zeigt, daß im Bereich einer Einspritzmenge von 5 μg bis 15 μg lineare Abhängigkeit zur Peakfläche besteht. Die Korrelationskoeffizienten betrugen jeweils 0.995. Die Nachweisgrenzen liegen im Bereich von 0.3 - 0.6 μg (s. exp. Teil).

Die relativen Standardabweichungen wurden durch fünfmaliges Einspritzen der jeweiligen Analysenlösungen ermittelt. Sie betrugen bei allen quantitativen Bestimmungen zwischen 0.32% und 2.72%.

2.8.1.2 Bestimmung von Primula-Extrakten und Zubereitungen

Es wurden die Saponine von insgesamt zwölf Drogen und Trockenextrakten, zwei Fluidextrakten und einem Fertig-arzneimittel bestimmt. Wie aus Tabelle 18 ersichtlich, ist bei allen untersuchten Extrakten Primulasaponin 1 nachweisbar. Primulasaponin 2 kommt in einigen Proben nicht oder nur in Spuren vor. Die ermittelten Gehalte von Primulasaponin 1 liegen in den Drogen zwischen 1.2% und 6.6%, jene von Primulasaponin 2 zwischen 1.9% und 4.5%. Es werden Gesamtgehalte bis zu 10.0% erreicht. Die Trockenextrakte können einen Gehalt von nahezu 20% Saponin erreichen. Der extrem niedrige Wert bei Droge 5 ist auf den hohen Anteil an fremden Bestandteilen dieser Charge zurückzuführen. Beim Trockenextrakt 12 rührt der vergleichsweise geringe Saponingehalt wahrscheinlich daher, daß mit Wasser extrahiert wurde. Die Werte der Fluidextrakte und der des Fertigarzneimittels sind wenig aussagekräftig, da offenbar unterschiedliche Herstellungsmethoden verwendet wurden.

Bei den Proben 1, 2, 9 und 10 handelt es sich um selbst gesammeltes, botanisch bestimmtes Drogenmaterial. Auffallend ist hier, daß sie alle nur Saponin 1 enthalten. Alle anderen Proben sind Handelsdrogen oder aus Handelsdrogen hergestellte Zubereitungen. Laut Auskunft der

Tab.18: Quantitative Bestimmung der Primulasaponine

Gehalt in % der Drogen- bzw. Extrakteinwaage			
Droge* (Herkunft)	Saponin 1	Saponin 2	Gesamt
1 (P.elatior, Deutschl.)	6.55	—	6.55
2 (P.veris, Deutschl.)	5.07	—	5.07
3 (P.veris, nicht dekl.)	5.57	4.45	10.02
4 (nicht dekl.)	4.86	3.71	8.57
5 (Jugoslawien)	1.20	Spuren	1.20
6 (Türkei)	2.51	2.88	5.39
7 (Albanien)	1.44	Spuren	1.44
8 (Bulgarien)	1.91	1.89	3.80
Trockenextrakte*			
9 (P. veris, Deutschl.)	19.60	—	19.60
10 (P. elatior, Deutschl.)	16.49	—	16.49
11 (Türkei)	8.39	11.50	19.89
12 (Alban./Bulgar.)	4.46	2.16	6.62
Fluidextrakte*			
13 (Bulgarien)	1.54	1.35	2.89
14 (Albanien)	0.44	0.54	0.98
Fertigarzneim.*			
15 (Expektysat Bürger)	44.8 mg/ 100 ml	52.8 mg/ 100 ml	97.6 mg/ 100 ml
* Probe 1,2,9,10 selbstgesammelt, botan. bestimmt			
" 3 Handelsdroge Fa. Klenk, Schweinfurt			
" 4 Handelsdroge Fa. Galke, Gittelde			
" 5,13 bezogen von Fa. Finzelberg, Andernach			
" 6,7,8,11,12,14 bezogen von Fa.Birkenweg, Kleinostheim			
" 15 Extraktpräparat, bezogen von Fa. Bürger, Bad Harzburg			

Bezieherfirmen kommen diese ohne nähere botanische Angaben ausschließlich aus den Balkanländern. Es scheint demnach innerhalb der beiden Arten eine große Variabilität bezüglich der Saponinkomponenten zu bestehen. Wahrscheinlich ist sie auf Standortunterschiede oder auf den Erntezeitpunkt zurückzuführen. So war in den in Deutschland gesammelten Drogen kein Saponin 2 nachweisbar, während in den Handelsdrogen zumindest geringe Mengen enthalten waren.

Die erhaltenen Ergebnisse korrelieren mit den früheren Bestimmungsmethoden (31, 119, 120, 122), die für die Droge im Durchschnitt ebenfalls Saponingehalte zwischen 5% und 9% ermittelten. Als Mindestsaponingehalt (gesamt) sollte für Drogen ein Wert von 4% und für Trockenextrakte von 12% festgelegt werden.

2.8.1.3 Vergleich mit anderen Methoden

Im Vergleich zu den in Abschnitt 2.4 beschriebenen Bestimmungsmethoden zeichnet sich die vorgestellte HPLC-Methode durch geringere Standardabweichungen und kürzere Analysendauer aus. Die Bestimmung eines Extraktes dauert mit Vorreinigung und HPLC-Trennung etwa 35 min. Die HPLC-Bestimmung ist automatisierbar. Neben der quantitativen Bestimmung der genuinen Primulasaponine liefert jede Analyse einen Fingerprint, der es gleichzeitig erlaubt, sich ein genaues Bild von der vorliegenden Droge zu machen. Die hämolytische Wertbestimmung kann allgemein nur als sehr grobes Maß für den Saponingehalt einer Droge gelten. Eine Korrelation zwischen den mit chromatographischen Methoden und über den hämolytischen Index erhaltenen Werten ist problematisch. Im Falle von *Primulae radix* wurde jedoch von GLASL und IHRIG (31) eine ungefähre Korrelation mit der DC-Methode festgestellt.

Allen DC-Methoden gemeinsam ist die Tatsache, daß Überlagerungen von Substanzzonen (bei Pflanzenextrakten sehr

häufig) kaum bemerkbar sind und so zu falschen Ergebnissen führen können. Die HPLC-Methode hingegen ermöglicht eine bessere Kontrolle der Peakreinheit über die Peakform und -symmetrie und - bei Einsatz eines Photodiodenarray-detektors - durch Ermittlung der Signalverhältnisse bei zwei verschiedenen Wellenlängen (Ratiobildung) und Aufnahme von UV-Spektren an verschiedenen Stellen des Peaks (94). Ein weiterer Nachteil der DC-Methoden besteht im Falle der Saponinbestimmung in den zur Detektion verwendeten unspezifischen Nachweisreaktionen (z.B. konzentriertes H_2SO_4), die nur bei sehr genauer Einhaltung der Reaktionsbedingungen reproduzierbare Ergebnisse liefern.

2.8.2 Bestimmung der Phenolglykoside und deren Aglykone

Die Phenolglykoside stellen für *Primulae radix* typische Inhaltsstoffe dar, die evtl. zu einer Unterscheidung der beiden Stammpflanzen *P. veris* und *P. elatior* herangezogen werden sollten. Die für den Geruch der Primelwurzel verantwortlichen Aglykone, die auch genuin in vielen Extrakten nachweisbar waren (s. Abschnitt 2.5.2), wurden im Zuge der in unserem Arbeitskreis durchgeführten Arbeiten über die in-vitro-Hemmung der Prostaglandin-Biosynthese durch phenolische Verbindungen (134) getestet, und wiesen eine im Vergleich zu anderen natürlich vorkommenden Salicylsäurederivaten gute Wirkung auf (135).

Es war daher angezeigt, die Phenolglykoside sowie ihre Aglykone auch quantitativ zu bestimmen.

2.8.2.1 Modelltrennung und Erstellung einer Eich-tabelle

Um die Phenolglykoside und die Aglykone in einem Lauf zu trennen, war bei der HPLC eine Gradientenelution erforderlich. Ein Gradient von 15% auf 55% Acetonitril in Wasser (Phosphorsäurezusatz) in 25 min auf einer RP-18-Säule erwies sich als geeignet. Die Detektion erfolgte

diesmal im gemeinsamen Maximum der Verbindung bei 209 nm (TS 10). Das Trennsystem wurde anhand einer Modellmischung aus Primulaverin, Primverin, 5- bzw. 4-Methoxysalicylsäuremethylester und 5- bzw. 4-Methoxysalicylsäure optimiert (Abb.41 a).

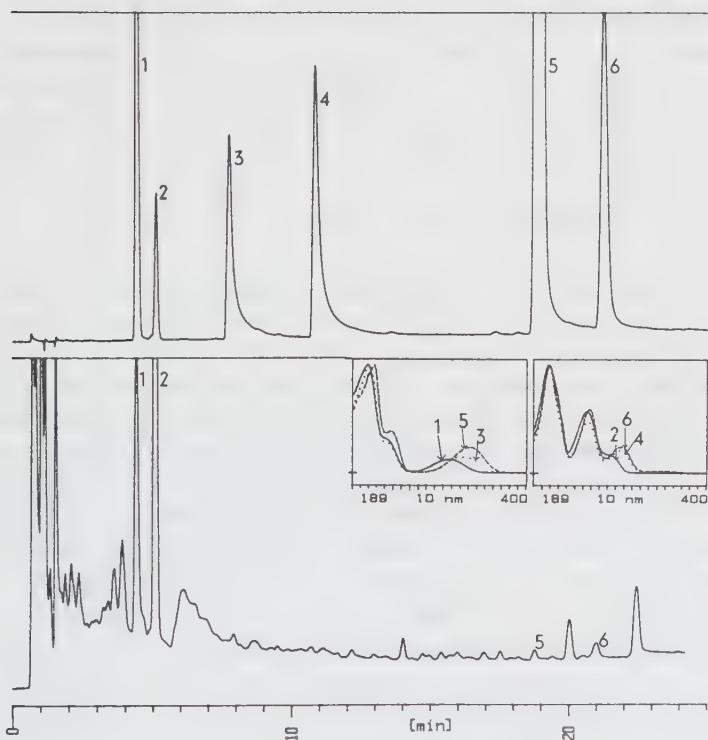


Abb.41: HPLC-Trennung (TS 10) der Phenolglykoside und ihrer Aglykone, Modelltrennung (a), Beispiel eines Extraktes (b), 1 = Primulaverin, 2 = Primverin, 3 = 5-Methoxysalicylsäure, 4 = 4-Methoxysalicylsäure, 5 = 5-Methoxysalicylsäuremethylester, 6 = 4-Methoxysalicylsäuremethylester

Da uns weder die Glykoside noch die beiden Ester in ausreichender Menge und hoher Reinheit zur Verfügung standen, ermittelten wir approximative Responsefaktoren, die für die Auswertung nach der Methode des externen Standards herangezogen wurden. Durch mehrmaliges Einspritzen einer Lösung der kristallin zur Verfügung stehenden Säuren wurden für die Responsefaktoren (eingespritzte Menge/Peakfläche) ermittelt. Aus diesen konnten aufgrund der gleichen Chromophore von Säure, Ester und Glykosid nach der in Abschnitt 3.7.1.1 beschriebenen Methode für die zu bestimmenden Verbindungen approximative Responsefaktoren ermittelt werden (s. exp. Teil).

2.8.2.2 Bestimmung von Extrakten

Es wurden 6 ausgewählte Drogen und Zubereitungen bestimmt. Abb.41 b zeigt ein Beispiel einer Trennung eines Fluidextraktes. Wie zu erkennen ist, sind die Säuren wie auch bei den anderen Proben nicht nachweisbar. Der Gehalt an 4- bzw. 5-Methoxysalicylsäureester ist gering. Die Bestimmung erfolgte nach einer Probenvorbereitung über Sep-Pak-C₁₈-Kartuschen. Im Gegensatz zur Saponinbestimmung wurde der Extrakt jedoch in Methanol gelöst und direkt mit Methanol wieder eluiert (s. exp. Teil), um Verluste der polaren Phenolglykoside zu vermeiden.

Tab.19 zeigt, daß die Ester meist nur in sehr geringer Menge vorkommen. Primulaverin und Primverin liegen zum Teil in beträchtlichen Mengen vor, jedoch oft in sehr unterschiedlichem Verhältnis. In Probe 12 und 14 waren nur Spuren der Phenolglykoside nachweisbar, Probe 14 enthielt dafür relativ viel 5- bzw. 4-Methoxysalicylsäureester. Die aufgeführten Werte stellen in die eine oder andere Richtung Extremwerte dar. Alle anderen untersuchten Proben bewegten sich zwischen diesen Werten.

Tab.19: %-Gehalt an Phenolglykosiden und den Aglykonen
bezogen auf die Trockenextrakteinwaage

Probe*	Primula- verin	Prim- verin	5-Methoxy salicyls.	4-Methoxy salicyls.
2 (P. veris auth.)	0.66	6.27	0.03	0.08
7 (Albanien)	1.26	3.95	0.05	0.11
5 (Jugoslawien)	6.38	1.05	0.04	0.30
12 (Alban./Bulgar.)	-	0.05	0.02	0.06
13 (Bulgarien)	1.14mg/ml	2.03mg/ml	0.02mg/ml	0.03mg/ml
14 (Albanien)	0.03mg/ml	0.08mg/ml	0.23mg/ml	0.14mg/ml

* Proben 2,7,5 Drogen, 12 Trockenextrakt, 13,14 Fluidextrakte

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Ergebnisse kann eine Unterscheidung der Stammpflanzen anhand des Phenolfingerprints nicht getroffen werden. Eine Beteiligung der freien Aglykone an der pharmakologischen Gesamtwirkung von Extrakten ist wegen der geringen Gehalte auszuschließen. Zu diskutieren wäre jedoch eine Freisetzung der Aglykone aus den Glykosiden im Verdauungstrakt.

3. HEDERAE FOLIUM

3.1 Verbreitung und botanische Einordnung

Die Stammpflanze der Droge *Hederae folium*, *Hedera helix* L., gehört zur Familie der Araliaceae, die 70 Gattungen mit etwa 700 Arten umfaßt. Die Familie wird in die Unterfamilien Schefflereae, Mackinlayeae, Myodocarpeae und Aralieae unterteilt. Die Gattung *Hedera* gehört zur erstgenannten Unterfamilie (136). *Hedera helix* L., der Efeu, ist in ganz Süd-, West- und Mitteleuropa weit verbreitet und erreicht Südsandinavien (52).

Die Droge ist im 2. AB-DDR, HPUS 64 sowie im HAB, 3. Nachtrag 1985 aufgeführt.

3.2 Inhaltsstoffe von *Hedera helix*

3.2.1 Chemie der Hederasaponine

Die Strukturaufklärung der Hauptsaponine von *Hedera*-Blättern (*Hedera helix* L.) wurde von TSCHESCHE, SCHMIDT und WULFF (149, 11) durchgeführt, die aufgestellten Strukturen später von MAHRAN und Mitarb. (150, 151) bestätigt. Das Monodesmosid α -Hederin, das bereits 1912 von VAN DER HAAR (152) isoliert wurde, enthält als Aglykon Hederagenin (Δ^{12} -Oleanen-Typ) und die beiden an die 3-OH-Gruppe gebundenen Zucker Arabinose und Rhamnose (endständig). Von dieser Verbindung leitet sich das Bisdesmosid **Hederacosid C** ab. Es enthält zusätzlich in Esterbindung an die 28-COOH-Gruppe eine zweite Zuckerkette, bestehend aus zwei Molekülen Glucose und einem Rhamnose (endständig). Bei alkalischer Hydrolyse des Glykosids oder Fermentation frischer zerkleinerter Blät-

ter entsteht aus Hederacosid C α -Hederin. **Hederacosid B**, das in der Droge nur in geringer Menge vorliegt, besitzt die gleichen Zuckerketten wie Hederacosid C, leitet sich aber von der Oleanolsäure ab, die sich von Hederagenin nur durch das Fehlen einer OH-Gruppe an C-23 unterscheidet. Hederacosid B liefert bei Hydrolyse der Esterbindung **β -Hederin**. β -Hederin und das früher beschriebene Hederacosid A, ein Hederageninglykosid mit einem Mol Glucose und Arabinose (153) waren in keiner der von TSCHESCHE und Mitarb. untersuchten Hedera-Proben nachweisbar. Durch schonende Aufarbeitung konnte gezeigt werden, daß Bis- und Monodesmoside genuin vorliegen. Das Mengenverhältnis von Hederacosid B zu C wird mit 15 : 100 (149) bzw. 1 : 5 (154) angegeben.

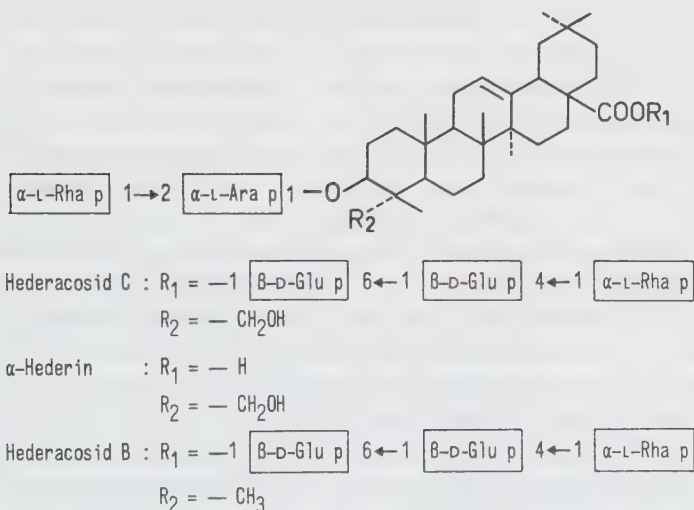


Abb.42: Hauptsaponine aus Hedera helix

3.2.2 Weitere Inhaltsstoffe

TRONCHET (155) fand in der Rinde junger Zweige Rutin, Spuren von Isoquercitrin und Kämpferol-3-O-rhamnogluco-
sid, Scopolin, Chlorogensäure, Isochlorogensäure sowie
Derivate der Ferula- und p-Cumarsäure. Das Wasserdampf-
destillat aus den Blättern enthält β -Elemen, Elixen und
Germacren B (156). Für ägyptische Varietäten von *Hedera*
helix wurde das Vorkommen von Emetin beschrieben (157).
Dieser Befund konnte jedoch seither nicht mehr bestätigt
werden.

3.3 Pharmakologie

α -Hederin besitzt im Gegensatz zu Hederacosid B und C
sehr starke hämolytische Aktivität (HI = 1 : 150000)
(6) und molluskizide Eigenschaften (7). Die vielen
Triterpensaponinen zukommende antimikrobielle und antivi-
rale Wirksamkeit ist bei den Hederasaponinen relativ
schwach ausgeprägt. Hederacosid C besitzt eine mit den
Primulasaponinen vergleichbare fungizide Wirksamkeit, die
antibakteriellen Eigenschaften sind nur schwach ausge-
prägt (11, 12, 158). Gegenüber Aescin und Primulasapo-
nin weist Hederacosid C deutlich schwächere antivirale
Aktivität auf (13). Bei der Prüfung auf antiexudative
Wirkung (am Ovalbuminödem bei Ratten) zeigte α -Hederin
gute Aktivität, Hederacosid C war praktisch unwirksam
(11). Weiterhin wurde für Hederacosid C eine fraßhem-
mende Wirkung auf Termiten beobachtet (14).

Die Anwendung von *Hedera*-Extrakten in Hustenmitteln
beruht auf ihren expektorierenden und schleimlösenden
Eigenschaften, die, wie bereits erwähnt, wahrscheinlich
auf einer Verflüssigung des zähen Bronchialschleims be-
ruhen (19). Der alkoholisch-wässrige Extrakt besitzt
außerdem eine schwache spasmolytische Wirkung (159).

3.4 Bisherige Bestimmungsmethoden

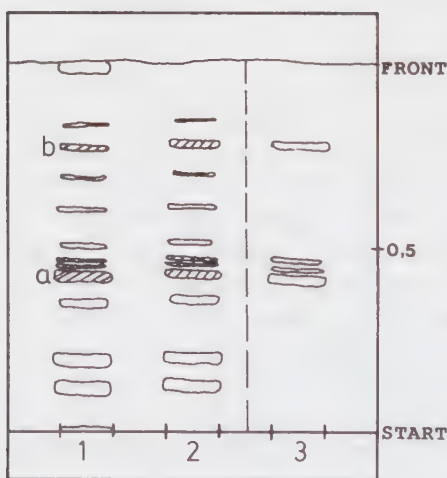
Zur Bestimmung der Saponine in Hedera-helix-Extrakten wurden bisher einige Verfahren vorgeschlagen. FRÖHLING (160) bestimmt nach Säurehydrolase des Gesamtextraktes die Aglykone ohne weitere Trennung durch Umsetzung mit Schwefelsäure/Acetanhydrid-Reagenz und Photometrie. KARTNIG und Mitarb. (119) trennten die Saponine dünn-schichtchromatographisch, eluierten sie und bestimmten sie nach Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure photometrisch bei 320 nm. GLASL und IHRIG (31) schlagen eine Methode vor, bei der die Saponine nach DC-Trennung und Detektion mit Schwefelsäure direkt über eine Remissionsmessung erfaßt werden.

3.5 HPLC-Analyse von Extrakten und Fertigarzneimitteln

3.5.1 Trennsystem und Probenvorbereitung

Auch für die HPLC-Trennung der Hederasaponine erwies sich ein Reversed-Phase-System (RP 18) mit Acetonitril/Wasser-Gemischen und Zusatz von Phosphorsäure als geeignet. Ein solches Trennsystem ist nach unseren Erfahrungen zur Saponinanalyse universell einsetzbar. Die Trennung muß je nach vorliegender Droge durch Wahl eines geeigneten Gradienten optimiert werden. Im Falle der Hederasaponine mußte wegen der sehr unterschiedlichen Polarität der Saponine (Hederacosid C: 5 Zucker, α -Hederin: 2 Zucker) ein relativ steiler Gradientenanstieg eingesetzt werden. Wir wählten einen zweistufigen Gradienten von 22% bis 32% Acetonitril in 10 min und anschließend von 32% bis 54% in 15 min (TS 11). Der zweistufige Anstieg ermöglichte eine Verkürzung der Analysendauer ohne Verschlechterung der Auflösung. Da die Hederasaponine als Δ^{12} -Oleanenderivate ausreichende Extinktion über 200 nm aufweisen, wurde bei 205 nm detektiert.

Eine Probenvorbereitung nach dem Muster von *Primulae radix* und *Hippocastani semen* mit der Abtrennung von hydrophilen Begleitstoffen über Sep-Pak-Kartuschen war hier nicht möglich, da, wie durch DC-Kontrolle nachweisbar, das relativ hydrophile Hederacosid C teilweise mit-eluiert wird. Es wurde daher auf die Abtrennung der hydrophilen Begleitstoffe verzichtet und der in Methanol gelöste Extrakt (Herstellung s. exp. Teil) direkt mit Methanol wieder von der Sep-Pak-Kartusche eluiert (s. exp. Teil). Das in den Blattextrakten enthaltene Chlorophyll läßt sich zur Schonung der Trennsäule auf diese Weise zum großen Teil abtrennen. Abb.43 zeigt die DC-Trennung eines *Hedera*-Extraktes vor und nach der Probenvorbereitung.



Zuordnung:

- 1, 3: Rohextrakt
2: Extrakt vorger.
a: Hederacosid C
b: α -Hederin

Det.: 1, 2 Komarowsky-R.
3 Nilblau-Reagenz

LM: DC TS 1

///// olivgrün

Abb.43: DC-Trennung eines *Hedera-helix*-Extraktes vor und nach der Vorreinigung

Aus Abb.43 geht hervor, daß die Abtrennung des Chlorophylls weitgehend gelungen war. Bei Detektion mit Nilblau-Reagenz entfärbten sich vier Zonen. Neben den Hauptzonen bei $R_f = 0.4$ und 0.8 sind zwei schwache Zonen bei etwa 0.45 zu erkennen. Bei den Komarowsky-positiven Zonen bei $R_f = 0.1$ und 0.2 handelt es sich wahrscheinlich um Oligosaccharide. Die Identifizierung der Saponine wird ausführlich in Abschnitt 3.6 behandelt.

3.5.2 HPLC-Trennungen von Hedera-Extrakten

3.5.2.1 Saponine

In Abb.44 I-V sind typische Trennungen von je zwei selbst hergestellten Drogenextrakten und Trockenextrakten des Handels sowie die eines Fertigarzneimittels mit den entsprechenden on-line aufgenommenen UV-Spektren dargestellt. Der mit S gekennzeichnete Peak ist der innere Standard.

Die Chromatogramme zeigen, daß in allen fünf Proben jeweils alle vier Hauptsaponine nachweisbar sind. Das Verhältnis der Peaks ist jedoch oft sehr unterschiedlich. Bei den in diesem Trennsystem nicht aufgelösten Peaks zwischen $R_t = 1 - 5$ min handelt es sich um Flavonoide und Derivate der Kaffeesäure, wie in Abschnitt 3.5.2.2 ausgeführt wird.

I Prospan^R- Tropfen, Ch.-Nr. 36119, Engelhard

II Trockenextrakt, Ch. 631/85, Birkenweg

V Droge, Ch. 718/4, Birkenweg

Die Chromatogramme dieser drei Proben sind für die HPLC-Trennung der Saponine von Hederae folium typisch. Die meisten untersuchten Proben zeigten diesen Fingerprint. Hederacosid C ist eindeutig die dominierende Verbindung. α -Hederin und Hederasaponin X sind in allen drei Proben

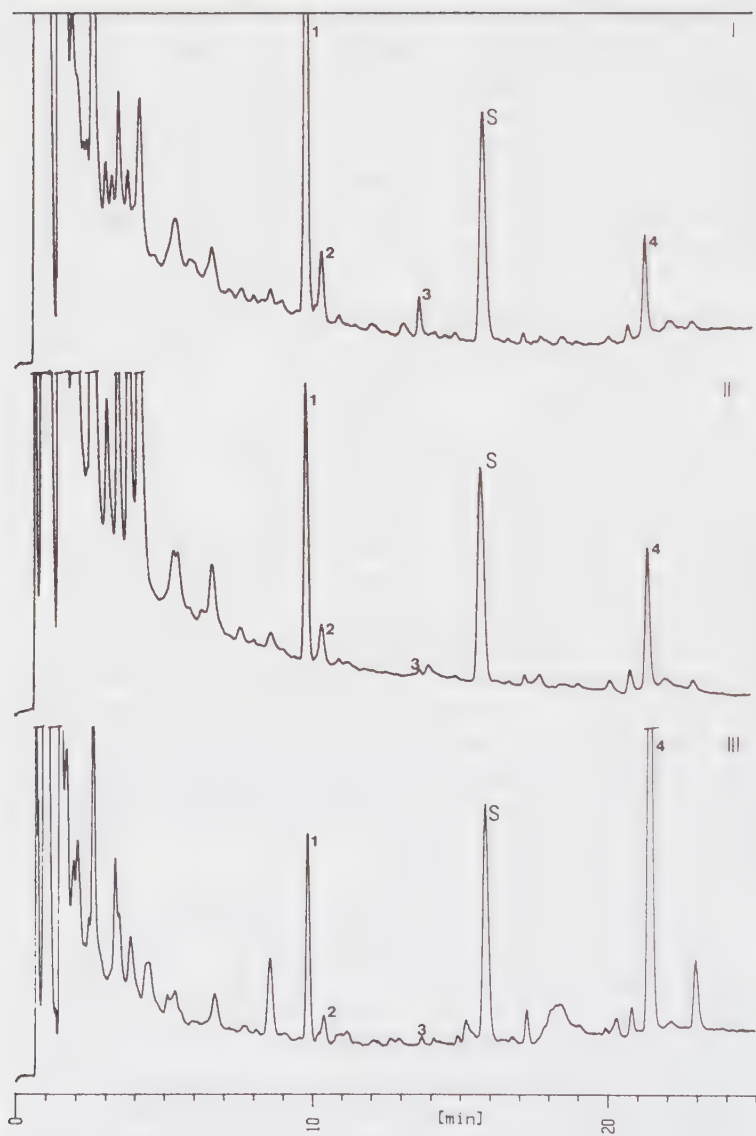


Abb. 44

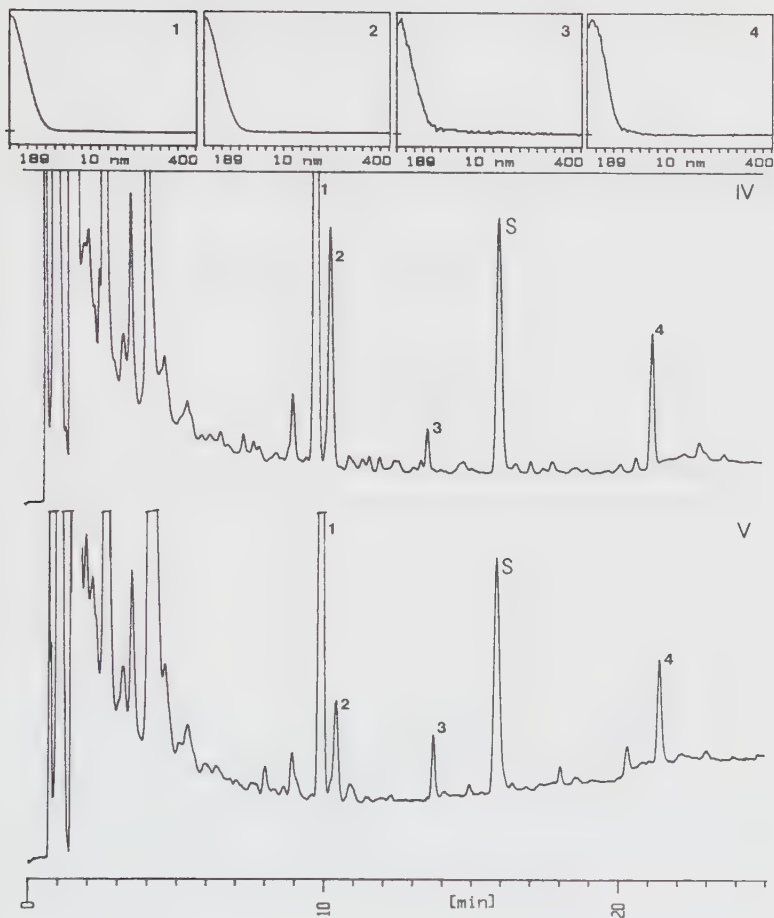


Abb.44: HPLC-Fingerprints (TS 11) von Hedera-helix-Drogen, -Trockenextrakten und eines Fertigarzneimittels mit den entspr. UV-Spektren. 1 = Hederacosid C, 2 = Hederasaponin X, 3 = Hederacosid B, 4 = α-Hederin, S = innerer Standard

deutlich nachweisbar. Hederacosid B ist in geringer Konzentration oder auch nur in Spuren (II) enthalten.

III Trockenextrakt 145/6, Birkenweg

Der Gehalt an Hederacosid C ist außergewöhnlich gering, der an α -Hederin überdurchschnittlich groß. Es tritt deutlich ein weiterer Peak auf ($R_t = 23.0$ min), der in Spuren auch in anderen Proben nachweisbar war. Er konnte als Hederagenin-3-O-arabinosid identifiziert werden (s. Abschnitt 3.6).

IV Droge Ch. 143/6 Birkenweg

Auffallend ist hier der ungewöhnlich hohe Gehalt an Hederasaponin X, das in den anderen Proben nur in geringer Menge vorkommt.

In einigen Fällen traten zusätzlich kleine Peaks mit $R_t = 9.0$ (Abb.44 IV), 17.3 (Abb.44 III) oder 20.3 min (Abb.44 V) auf. Bei ihnen könnte es sich nach den UV-Spektren ebenfalls um Saponine handeln. Aufgrund des Retentionsverhaltens könnte der Peak bei $R_t = 9.0$ min von einem Hederageninglykosid mit sechs bis sieben Zuckern stammen. Die Methode erlaubt die Erstellung eines charakteristischen Fingerprints von Drogen und deren Zubereitungen. Sie ist damit zur Identifizierung der Droge geeignet und ermöglicht die Abschätzung der Mengenverhältnisse der Hauptkomponenten.

3.5.2.1 Fingerprintanalyse der phenolischen Verbindungen (Kaffeensäurederivate und Rutin)

Um die in TS 11 nicht aufgetrennten Verbindungen zuordnen zu können und einen zusätzlichen Fingerprint der Droge zu erhalten, wurde ein weiteres Trennsystem erstellt. Die

HPLC-Analyse von Flavonoiden (138, 139) sowie von Pflanzensäuren und Kaffeesäureestern (140, 141, 142, 143) wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben. Für unsere Zwecke erwies sich ein Gradientensystem von 5% auf 30% Acetonitril in 30 min unter Phosphorsäurezusatz als geeignet. Die Detektion erfolgte mittels Photodiodenarray simultan bei den Wellenlängen 254, 325 und 380 nm (TS 12).

Abb.45 zeigt die erhaltenen Chromatogramme mit den on-line aufgenommenen UV-Spektren.

Es konnten sechs Peaks mit für Kaffeesäure typischen UV-Spektren (a) zugeordnet werden. Peak a_2 wurde durch Co-Chromatographie als n-Chlorogensäure (3-Caffeoylchinasäure), Peak b als Protocatechusäure identifiziert. Die Peaks a_{3-6} wiesen ähnliche Retentionszeiten wie die Verbindungen einer Isochlorogensäurefraktion (Gemisch aus isomeren Dicaffeoylchinasäuren) auf, waren jedoch nicht mit diesen identisch.

Nach HERMANN (141, 142) sind bei den Zimtsäurederivaten durch cis-trans-Isomerie und verschiedene Verknüpfungsmöglichkeiten der Säuren an der Chinasäure zahlreiche Isomere möglich, die in Pflanzen auch nachweisbar sind. Eine genaue Identifizierung dieser ubiquitär vorkommenden Verbindungen wäre praktisch nur über die Isolierung möglich gewesen (141). Eine eindeutige Zuordnung war auch für Peak d möglich. Es handelte sich um Rutin, wie durch Co-Chromatographie und Vergleich der UV-Spektren gesichert werden konnte.

Die Photodiodenarraydetektion liefert je nach gewählter Detektionswellenlänge sehr unterschiedliche Fingerprints. Durch die Detektion bei 380 nm erhält man einen Flavonoid-Fingerprint. Der Peak bei $R_t = 5.5$ min ist nur bei 254 nm erkennbar.

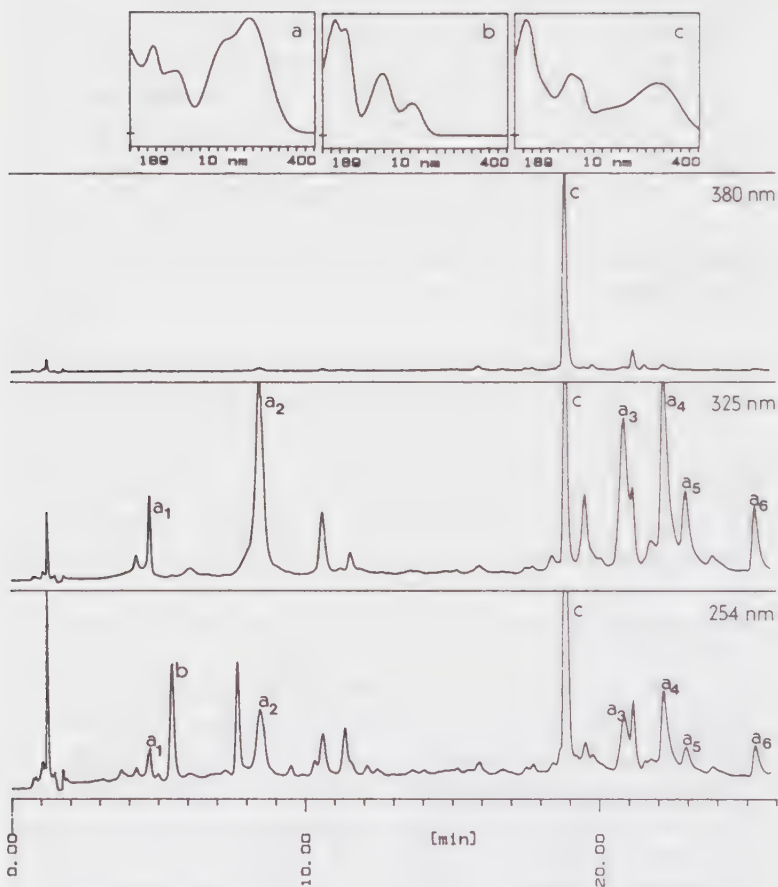


Abb.45: HPLC-Trennung phenolischer Inhaltsstoffe von *Hederæ folium* (TS 12), simultan detektiert bei drei Wellenlängen. Zuordnung s. Text

Isolierung und Identifizierung der Saponine

3.6.1 Isolierung von Hederacosid C, α -Hederin, Saponin X sowie Hederacosid B

Zur Herstellung einer Eichlösung sowie für strukturelle Untersuchungen war die Isolierung der beiden Hauptsaponine Hederacosid C und α -Hederin erforderlich.

Dazu wurde der Trockenextrakt (alkohol. Extrakt) in Wasser gelöst und mehrmals mit n-Butanol ausgeschüttelt. Die gewonnene Fraktion wurde durch Etherfällung weiter gereinigt. Es resultierte eine angereicherte Saponinfraktion, die viel Hederacosid C, aber wenig α -Hederin enthielt.

Diese Fraktion wurde durch Gelfiltration auf einer Sephadex G15-Säule getrennt, wobei die Saponine als relativ hochmolekulare Verbindungen zum großen Teil im Ausschlußvolumen eluiert wurden. Das erhaltene gelblich-weiße Saponingemisch enthielt ca. 70% Hederacosid C. Jeder Schritt der Isolierung wurde durch DC- und HPLC-Analyse überprüft.

Ein Teil des Saponingemisches wurde durch semipräparative HPLC mit 32%igem Acetonitril (TS 13) weiter aufgetrennt (Abb.46 I). Die Peaks bei $R_t = 22$ min (Hederacosid C) und 26 min (Saponin X) wurden aufgefangen und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Der andere Teil des Saponingemisches wurde mit Kalilauge hydrolysiert, wobei aus Hederacosid C quantitativ α -Hederin entstand. Durch semipräparative HPLC mit 47% Acetonitril (TS 14) wurde α -Hederin ($R_t = 23$ min) isoliert (Abb.46 II). Auf diese Weise erhielten wir durch wiederholtes Einspritzen in chromatographisch reiner Form ca. 25 mg Hederacosid C und 15 mg α -Hederin sowie 4 mg Saponin X, das jedoch mit Hederacosid C verunreinigt war. Die bei der analytischen Trennung (TS 11) bei $R_t = 13.7$ und 23 min auftretenden Verbindungen (Saponin Y bzw. Saponin Z), bei denen es sich nach den UV-Spektren eben-

falls um Saponine handeln mußte, wurden durch Auffangen von Fraktionen in diesem Trennsystem im Mikrogrammaßstab isoliert.

Durch fünfmaliges Einspritzen von 20 μ l Probelösung erhielten wir eine für mehrere DC-Untersuchungen ausreichende Menge. Bei der DC-Trennung der isolierten Substanzen zeigte sich, daß Saponin Y und Saponin X praktisch gleiche Rf-Werte aufwiesen (Abb.46).

3.6.2 Identifizierung der Saponine

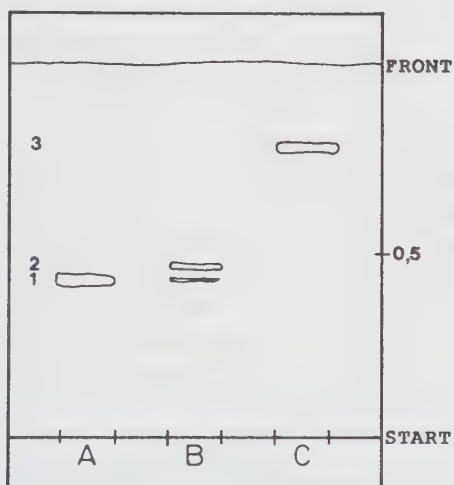
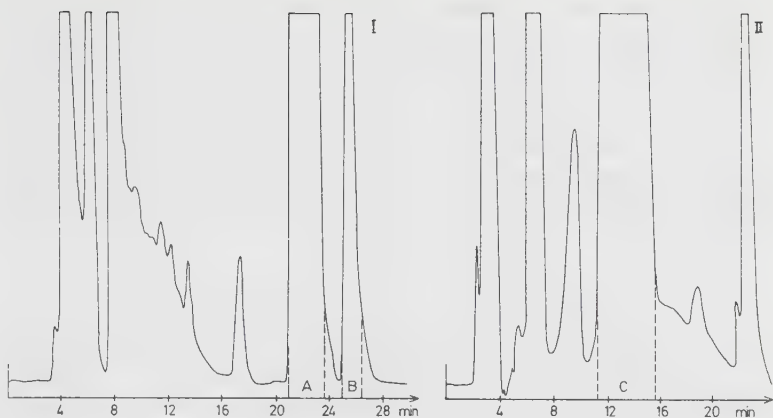
Die Identifizierung erfolgte durch dünnschichtchromatographische Methoden und FAB-MS.

3.6.2.1 DC-Untersuchungen

Alle fünf Substanzen wurden der Mikrohydrolyse unterzogen (97) und anschließend auf Aglykone (DC TS 6) und Zucker (DC TS 2) untersucht. Dabei erhielten wir das in Abb.47 gezeigte Bild.

Mit Ausnahme von Saponin Y enthalten alle isolierten Verbindungen als Aglykon Hederagenin. Saponin Y leitet sich von der Oleanolsäure ab. Es mußte sich also mit hoher Wahrscheinlichkeit um das beschriebene Hederacosid B handeln, das das einzige genuin in der Droge vorkommende Oleanolsäureglykosid darstellt.

Als Zuckerkomponenten enthielt Saponin Y Arabinose, Glucose und Rhamnose. Die Identität von Saponin Y als Hederacosid B kann aufgrund dieser Befunde und auch des Retentionsverhaltens (durch lipophileres Aglykon längere Retentionszeit als das entsprechende Hederageninglykosid Hederacosid C) als gesichert gelten. α -Hederin und Hederacosid C enthielten in Übereinstimmung mit der Literatur Arabinose und Rhamnose bzw. Glucose, Arabinose und Rhamnose. Saponin X lieferte ebenfalls Glucose, Arabinose und Rhamnose. Die Rhamnosezone war jedoch deutlich schwächer



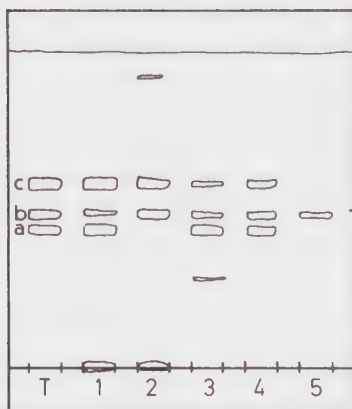
Zuordnung:

- 1: Hederacosid C
- 2: Hederasaponin X
- 3: α -Hederin

Det.: Komarowsky-Reag.

LM: DC TS 1

Abb.46: Semipräparative HPLC-Trennung von Hederacosid C (I) und α -Hederin (II) und dünn-schichtchromatographische Zuordnung



Zuordnung:

T: Testgemisch

a Glucose

b Arabinose

c Rhamnose

1: Hederacosid C

2: α -Hederin

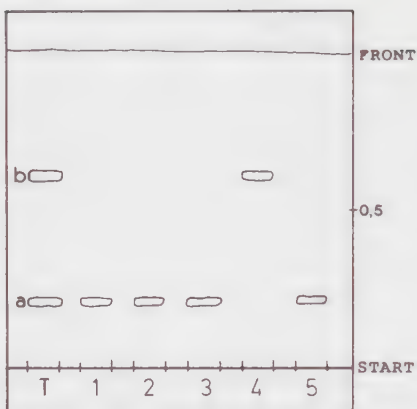
3: Saponin X

4: Saponin Y

5: Saponin Z

Det.: Diphenylaminophosphor-
säure-Reagenz

LM: DC TS 2



Zuordnung:

T: Testgemisch

a Hederagenin

b Oleanolsäure

Det.: Komarowsky-Reag.

LM: DC TS 6

Abb.47: Mikrohydrolyse der isolierten Saponine

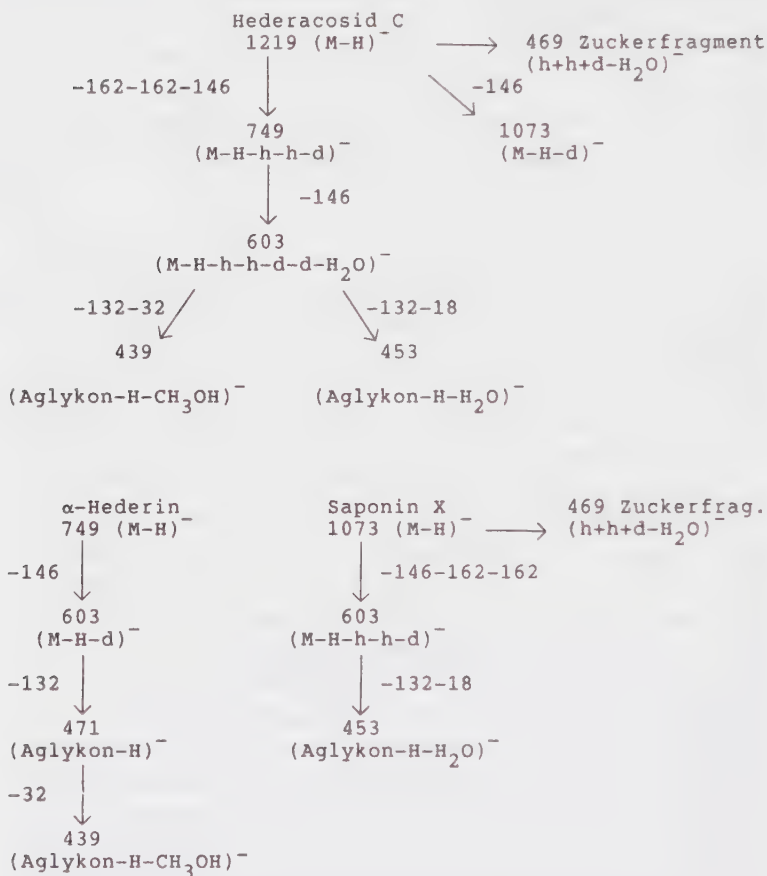
als bei Hederacosid C, was als Hinweis auf ein um ein Mol Rhamnose ärmeres Saponin zu werten war. Saponin Z enthielt nur Arabinose. Es handelte sich somit um Hederagenin-3-O-arabinosid, das bereits von HOSTETTMANN (161) aus den Beeren von *Hedera helix* isoliert wurde. Die endgültige Zuordnung von α -Hederin, Hederacosid C sowie Saponin X erfolgte durch FAB-Massenspektrometrie.

3.6.2.2 FAB-MS der Hederasaponine

Die Ergebnisse mit der Zuordnung der Fragmentationen sind in Tab.20 aufgeführt. In allen Fällen kam die Negativ-Ionen-Detektion zu Einsatz.

α -Hederin besaß wie erwartet ein Molekulargewicht von 750, womit bewiesen war, daß das Saponin zwei Zucker und zwar eine Pentose und eine Desoxyhexose enthält. Aufgrund der Abspaltung von 146 aus dem $M-H]^{-}$ -Ion ist zu schließen, daß die Rhamnose endständig vorliegt. Das Vorhandensein von zwei Zuckerbindungsstellen war auszuschließen, da in diesem Fall neben $M-H-146$ auch $M-H-132$ aufgetreten wäre. Das Aglykon (Hederagenin) besitzt ein Molekulargewicht von 472. Es enthält eine $-CH_2OH$ -Gruppe, was durch die Abspaltung von CH_3OH (= 32) aus dem Aglykonfragment belegbar war. Der Hauptfragmentierungsweg bei bidesmosidischen Saponinen besteht in der Abspaltung der ester gebundenen Zuckerkette als Gesamtheit. Die Abspaltung führt meist zum stärksten Signal (außer den Matrixpeaks) des Spektrums (107). Dieses Verhalten ist bei Hederacosid C zu beobachten. Aus dem Molekülion $(M-H)^{-}$ 1219, das beweist, daß das Molekül zwei Hexosen, zwei Desoxyhexosen und eine Pentose enthält, entsteht durch Abspaltung der Zuckerkette an C-28 das Ion m/e 749 (entspricht α -Hederin) als intensives Signal. Das abgespaltene Trisaccharid (2 Mol Glucose, 1 Mol Rhamnose) tritt als Ion bei m/e 469 in Erscheinung. Weiterhin ist die Abspaltung einer endständigen Rhamnose aus der an 3-OH-Gruppe gebundenen

Tab.20: FAB-MS-Fragmentierung der Hederasaponine



h = Hexose d = Desoxyhexose p = Pentose

Zuckerkette zu erkennen.

Aus der Abspaltung einer Rhamnose aus dem Ion m/e 749 geht hervor, daß sie ebenfalls endständig ist. Das Aglykonion bei 471 war nicht zu beobachten. Dafür ließen sich die durch Wasser- bzw. Methanolabspaltung aus dem Aglykon

hervorgehenden Ionen 453 und 439 nachweisen. Damit war die Identität des Saponins gesichert. Der Vergleich der Spektren von α -Hederin und Hederacosid C mit Literaturdaten (107, 106) ergab ebenfalls volle Übereinstimmung. Saponin X besitzt ein Molekulargewicht von 1074, was einer Zuckerzusammensetzung von zwei Hexosen und je einer Desoxyhexose und Pentose entspricht. Es enthält also ein Molekül Rhamnose weniger als Hederacosid C. Das intensive Ion m/e 603 entsteht analog Hederacosid C durch Abspaltung einer esterartig gebundenen Zuckerkette, der ebenfalls das Ion m/e 469 (2 x Glucose, 1 x Rhamnose) zukommt. Das Aglykonfragment 453 war ebenfalls nachweisbar. Es handelt sich bei Saponin X also um ein Bidesmosid des Hederagenins, das am C-3-OH nur Arabinose und am C-28-COOH die gleiche Zuckerkette wie Hederacosid C aufweist. Die etwas längere Retentionszeit von Saponin X gegenüber Hederacosid C (TS 11) sowie der höhere Rf-Wert bei der DC-Trennung stehen damit im Einklang.

3.7.1 Quantitative Bestimmung der Hederasaponine

Die quantitative Bestimmung der vier identifizierten Hauptsaponine erfolgte in TS 11 nach der Methode des inneren Standards. Als Standardsubstanz diente p-Hydroxybenzoesäurepropylester. Um eventuell auftretende Verluste auszugleichen wurde die Standardlösung vor der Probenvorbereitung zugegeben. Zur Herstellung einer Eichlösung standen reines α -Hederin und Hederacosid C zur Verfügung. Für diese beiden Saponine wurden Standardkorrekturfaktoren ermittelt (s. exp. Teil). Für die Bestimmung von Hederacosid B konnte wegen der identischen Chromophore und dem sehr ähnlichen Molekulargewicht (Hederacosid C: 1220, Hederacosid B: 1204) mit vernachlässigbarem Fehler der gleiche Standardkorrekturfaktor wie für Hederacosid C benutzt werden. Für das ebenfalls den gleichen Chromophor enthaltende Saponin X wurde unter Berücksichtigung des

geringeren Molekulargewichts von 1074 ebenfalls ein Standardkorrekturfaktor berechnet (s. exp. Teil). Diese Vorgehensweise ermöglicht eine relativ genaue Quantifizierung der nicht als Eichsubstanzen zur Verfügung stehenden Nebensaponine.

3.7.1.1 Eichgeraden, Standardkorrekturfaktoren, Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenzen

Die durch fünfmaliges Einspritzen von 10 μl der Eichlösung (s. exp. Teil) erhaltenen Peakflächen wurden gemittelt und die Standardkorrekturfaktoren berechnet.

$$\begin{aligned}f(\text{Hederacosid C}) &= 3.9899 \cdot 10^{-2} \\f(\alpha\text{-Hederin}) &= 6.8830 \cdot 10^{-2}\end{aligned}$$

Der approximative Standardkorrekturfaktor für Saponin X (s. exp. Teil) betrug $4.5322 \cdot 10^{-2}$.

Durch Einspritzen verschiedener Mengen der Eichlösung wurden Eichgeraden erstellt (Abb.48), an denen die Linearität der Abhängigkeit der eingespritzten Menge von der Peakfläche überprüft wurde.

Aus Abb.48 geht hervor, daß bei den Saponinen im Bereich von 1 – 20 μg lineare Abhängigkeit der eingespritzten Menge zur Peakfläche besteht. Die Korrelationskoeffizienten betrugen 0.999 und 1.000. Die Nachweisgrenzen lagen für die Saponine bei etwa 0.2 μg . Die Standardabweichungen betrugen bei allen quantitativen Bestimmungen für Hederacosid C zwischen 0.56 und 1.91%, für α -Hederin zwischen 1.2 und 5.0% (5 Einspritzungen) (s. auch exp. Teil).

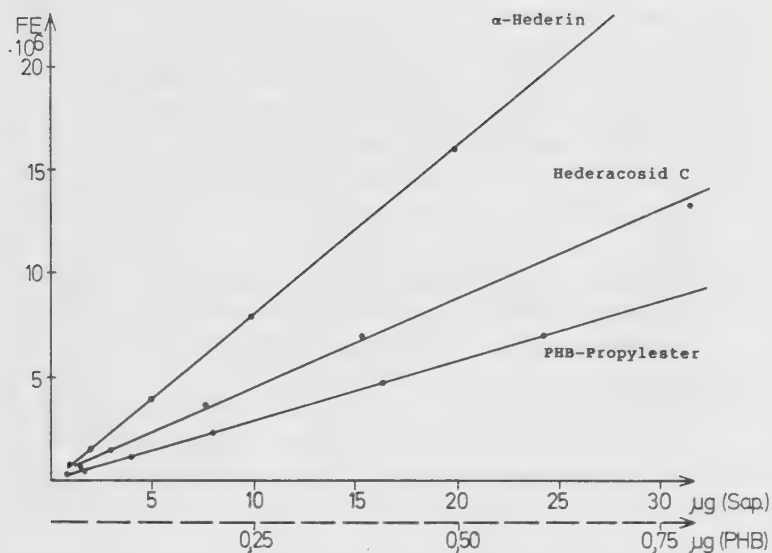


Abb.48: Eichgeraden von Hederacosid C, α -Hederin und dem inneren Standard (PHB-Propylester)

3.7.1.2 Bestimmung von Extrakten und Fertigarzneimitteln

Es wurden die Saponingehalte von vier Drogen, fünf Trockenextrakten, einem Fluidextrakt und sechs Fertigpräparaten (Hustentropfen) bestimmt. Die Ergebnisse (Mittelwerte aus drei bis fünf Bestimmungen) sind in Tab.21 dargestellt. Die Prozentangaben beziehen sich auf die zur Bestimmung verwendete Einwaage an Trockenextrakt. Die Saponingehalte der Drogen erhält man durch Berechnung über die Extraktausbeuten. Bei den Flüssigpräparaten beziehen sich die Gehalte auf die laut Deklaration in den Präparaten enthaltenen Trockenextraktmengen (s. exp. Teil). Diese Darstellung ermöglicht einen direkten Vergleich der verschiedenen Zubereitungen.

Tab.21: Quantitative Bestimmung der Hauptsaponine aus *Hedera helix*

Prozentgehalte bezogen auf die Trockenextrakteinwaagen

Probe	Hederacosid C	Hederasaponin X	Hederacosid B	α -Hederin	Gesamt
1 Trockenextrakte ^o aus Droge	20.18	2.16	1.14	1.27	24.75
2 " 1	24.39	2.35	0.98	1.38	29.10
3 " 2	15.30	5.57	1.29	0.83	22.99
4 " 3	18.30	4.65	0.74	1.38	25.07
5 Trockenextrakte des Handels	4.07	0.90	0.14	2.13	7.24
6 " "	6.91	0.77	0.20	1.09	8.97
7 " "	4.52	0.79	--	1.54	6.85
8 " "	7.19	1.16	0.18	1.07	9.60
9 " "	4.39	0.71	--	8.48	13.58
10 Flüssigarznei- mittel	10.40	1.35	0.35	1.55	13.65
11 " "	4.65	0.73	--	1.68	7.06
12 " "	10.50	1.35	0.55	1.60	14.00
13 " "	4.20	0.73	0.20	0.90	6.03
14 " "	2.28	0.55	--	0.83	3.66
15 " "	10.8	1.57	0.78	1.20	14.35
16 Fluidextrakt	6.01 mg/ml	3.25 mg/ml	0.48 mg/ml	0.40 mg/ml	10.14 mg/ml

^o Extraktausbeute: 20.3% (versch. Chargen von Prospan^R Tropfen)

1 " 19.7% bezogen von Fa. Engelhard, Frankfurt

2 " 10.8% bezogen von Fa. Finzelberg, Andernach

3 " 17.8% bezogen von Fa. Birkenweg, Kleinostheim

Wie aus Tab.21 hervorgeht, liegen Hederacosid C und α -Hederin in den Blättern genuin im Verhältnis 13 : 1 bis 18 : 1 vor. Eine Verschiebung dieses Verhältnisses zugunsten von α -Hederin spricht für eine stattgefundene Teilhydrolyse der als Ester gebundenen Zuckerkette bei Trocknung, Lagerung oder Aufarbeitung der Droge. Bei den aus dem Handel bezogenen Trockenextrakten liegt dieses Verhältnis zwischen 2 : 1 und 7 : 1, bei den untersuchten Fertigarzneimitteln zwischen 9 : 1 und 3 : 1. Daraus ist zu schließen, daß hydrolytische Prozesse vor allem bei der Aufarbeitung der Droge, weniger bei der Lagerung der Fertigarzneimittel selbst auftreten. Bei den Fertigarzneimitteln wurde der ermittelte Absolutgehalt auf die laut Deklaration im Untersuchungsvolumen enthaltenen Trockenextraktmengen bezogen. Die so errechneten Saponingehalte bewegen sich im Rahmen der handelsüblichen Trockenextrakte.

Die von uns durch dreimalige Extraktion der Pulverdroge mit Methanol hergestellten Trockenextrakte wiesen durchweg erheblich höhere Saponingehalte auf als die Handelsextrakte, die laut Auskunft der Hersteller aus grob zerkleinerter Droge mit Methanol-Wasser-Gemischen gewonnen werden.

Probe 9 ist ein Beispiel für einen Trockenextrakt, bei dem offenbar ein starker hydrolytischer Abbau von Hederacosid C erfolgt sein muß, da der α -Hederingehalt stark erhöht ist.

Das bisher nicht in der Literatur beschriebene Saponin X war in allen Proben wie z.B. in den Proben 3, 4 und 16 in relativ hohen Mengen nachweisbar. Hederacosid B war allgemein nur in geringen Mengen enthalten und fehlte in manchen Extrakten sogar völlig.

Nach den vorliegenden Ergebnissen sind bei geeigneter Ausgangsdroge und richtiger Wahl des Extraktionsmittels für Trockenextrakte Saponingehalte von 10 - 12% erreichbar.

In Anlehnung an WAGNER, TITTEL und BLADT (138) wurde nach der Methode des externen Standard bei einigen Proben auch der Rutingehalt bestimmt. Er betrug bezogen auf die Trockenextrakteinwaage zwischen 0.4 und 3.2%, bezogen auf die Drogeneinwaage zwischen 0.08 und 0.63%.

3.7.1.3 Vergleich mit anderen Bestimmungsmethoden

Die Methode bietet im Gegensatz zu den bisherigen Verfahren die Möglichkeit, neben dem Hauptsaponin Hederacosid C auch die drei anderen, in geringerer Menge vorliegenden Saponine zu bestimmen. KARTNIG u. Mitarb. (119) fanden nur die beiden Saponine Hederacosid C und B. Die von ihnen angegebenen Gehalte von ca. 6% Hederacosid C und 1.5% Hederacosid B bezogen auf die Droge dürften überhöht sein. Bei unseren Untersuchungen wies keine der Proben einen Gehalt von über 4.8% Hederacosid C und 0.23% Hederacosid B bezogen auf die Droge auf. GLASL und IHRIG (31) konnten α -Hederin nicht oder nur in Spuren nachweisen, obwohl, wie die Tab.21 zeigt, in allen von uns untersuchten Proben α -Hederin in beachtlicher Menge nachweisbar war. Die Bestimmung von α -Hederin ist aber wegen seiner von den Hederacosiden abweichenden biologischen Eigenschaften (starke hämolytische Aktivität) von Interesse.

Der hämolytische Index ist als Bestimmungsmethode für *Hederae folium* völlig ungeeignet, da Saponine mit sehr starker (α -Hederin) und sehr schwacher (Hederacoside) hämolytischer Aktivität nebeneinander vorliegen. Eine echte Korrelation zwischen den durch Bestimmung des hämolytischen Index und den nach der DC-Methode (31) erhaltenen Saponingehalten besteht nicht.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde ein universell anwendbares Verfahren zur **Fingerprintanalyse, Standardisierung und quantitativen Bestimmung** von saponinhaltigen **Drogen, Extrakten und Fertigarzneimitteln** entwickelt. Von allen geprüften Verfahren erwies sich die **Reversed-Phase-HPLC** auf **C₁₈-Material** mit **Acetonitril-Wasser-Gemischen** unter Zusatz von **Phosphorsäure** als die geeignetste Methode. Die Trennung kann bei verschiedenen Drogen allein durch Veränderung des Acetonitril-Anteils sowie des Gradienten angepaßt und optimiert werden. Die Detektion erfolgte mit einem **UV-Detektor** bei Wellenlängen von **195 - 210 nm**. Die Identifizierung der Saponine erfolgte durch **on-line-UV-Spektroskopie** mit einem **Photodiodenarray-Detektor**, **DC-** sowie **MS-Methoden**. Zur Identifizierung ausreichende Mengen lassen sich durch **semipräparative** oder sogar **analytische HPLC** in relativ kurzer Zeit isolieren. Durch diese allgemein anwendbare Kombination lassen sich die Saponine eines beliebigen auch unbekannten Drogenextrakts in Mengen von unter 1 mg ausreichend charakterisieren. Besitzen zwei Saponine das gleiche Aglykon und die gleiche Anzahl an Zuckern ist mit unvollständiger Auflösung zu rechnen. Als Vorreinigung bewährte sich die Filtration über **C₁₈-Kartuschen**. Durch Wahl der Lösungsmittelzusammensetzung war eine Anpassung der Probenvorbereitung bei den verschiedenen Drogen möglich.

2. Hippocastani semen

β -Aescin und das Saponingemisch des Roßkastaniensamens wurden getrennt und die erhaltenen Peaks strukturell zugeordnet. Durch Umacylierung von β -Aescin gelang die Herstellung eines Saponingemisches, das alle in Aesculus-Extrakten nachweisbaren Saponine (β -Aescin und Kryptoaescin) enthielt.

Handelsübliches β -Aescin erwies sich für die Verwendung als Eichsubstanz bei der quantitativen Bestimmung wegen von Charge zu Charge unterschiedlicher Zusammensetzung als ungeeignet. Durch alkalische Hydrolyse war aus verschiedenen β -Aescinen ein einheitliches Deacetyl-saponingemisch gewinnbar, das als Eichsubstanz verwendbar war. Die HPLC-Gesamtsaponinbestimmung nach alkalischer Hydrolyse, die auch für Fertigarzneimittel anwendbar war, lieferte für die Droge Gehalte zwischen 2.8 und 5.0%.

3. Primulae radix

In der Droge waren zumeist zwei Saponine (Primulasaponin 1 und 2), in einigen Fällen nur eines (Primulasaponin 1) nachweisbar.

Saponin 1 ist ein bereits beschriebenes Protoprimulagenin-A-tetraglycosid. Saponin 2 wurde von uns erstmals in reiner Form isoliert. Nach GC-, DC-, FAB-MS- und EI-MS-Untersuchungen kommt dem Saponin 2 die Struktur eines Protoprimulagenin-A-pentaglykosides zu. Es unterscheidet sich von Saponin 1 durch eine zusätzliche, endständig an Glucose 1-4 gebundene Xylose. Die quantitative Bestimmung ergab für die Droge für Saponin 1 Gehalte zwischen 1.9 und 6.5%, für Saponin 2 zwischen 1.9 und 4.5%.

Zusätzlich wurden die Phenolglykoside Primulaverin und Primverin sowie deren Aglykone getrennt, identifiziert und quantitativ bestimmt. Die Gehalte an Primulaverin betrugen auf die Droge bezogen zwischen 0.2 und 2.3%,

an Primverin zwischen 0.4 und 2.2%. Die Aglykone lagen in geringer Menge (meist unter 0.1%) vor.

Beide Stammpflanzen enthalten die gleichen Saponine und sind als gleichwertig zu betrachten. Eine Unterscheidung der Stammpflanzen über die Phenolglykoside ist wegen der starken Schwankungen des Gehalts nicht möglich.

4. *Hederae folium*

Neben den bekannten Saponinen **Hederacosid C**, **Hederacosid B** und **α -Hederin**, wurden zwei in dieser Droge bisher nicht beschriebene Saponine identifiziert. **Hederasaponin X** unterscheidet sich von Hederacosid C durch das Fehlen einer endständigen Rhamnose an der 3-OH-ständigen Zuckerkette. Außerdem wurde in geringer Menge Hederagenin-3-O-arabinosid aufgefunden.

Die quantitativen Bestimmungen ergaben bezogen auf die Droge für Hederacosid C Werte von 1.7 - 4.8%, für Hederasaponin X von 0.4 - 0.8%, für Hederacosid B von 0.1 - 0.2% und für α -Hederin von 0.1 - 0.3%.

Für die phenolischen Inhaltsstoffe Rutin, Protocatechusäure, Chlorogensäure sowie weitere Kaffeesäurederivate wurde ebenfalls ein HPLC-Trennsystem entwickelt.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

1. HERKUNFT DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS UND DER VERGLEICHSSUBSTANZEN

1.1 Drogen

- Semen Hippocastani, Ch.-Nr. 5008 500, Fa. Finzelberg, Andernach
- Semen Hippocastani-Pulver, Muster-Nr. 142/6, Fa. Birkenweg, Kleinostheim
- Semen Hippocastani pulv., Praktikumsdroge des Instituts
- Radix Primulae (Türkei), Muster-Nr. 860/5, Fa. Birkenweg, Kleinostheim
- Radix Primulae (Albanien), Muster-Nr. 861/5, Fa. Birkenweg, Kleinostheim
- Radix Primulae (Bulgarien), Muster-Nr. 862/5, Fa. Birkenweg, Kleinostheim
- Radix Primulae (P. elatior, Jugoslawien), Ch.-Nr. 5411500, Fa. Finzelberg, Andernach
- Radix Primulae, Handelsdroge Fa. Klenk, Schweinfurt
- Radix Primulae, Handelsdroge Ch.-Nr.976/4, Fa. Galke, Gittelde
- Radix Primulae (P. elatior, Deutschland), selbstgesammelt u. botanisch bestimmt
- Radix Primulae (P. veris, Deutschland), selbstgesammelt u. botanisch bestimmt
- Folium Hederae gemahlen, Fa. Finzelberg, Andernach
- Folium Hederae-Pulver, Muster-Nr. 143/6, Fa. Birkenweg, Kleinostheim
- Folium Hederae, Muster-Nr. 718/4, Fa. Engelhard, Frankfurt
- Folium Hederae, Muster-Nr. 5417/300, Fa. Engelhard, Frankfurt

1.2 Trockenextrakte

- Extr. Hippocastani sicc. Ch.-Nr. 1502 530,
Fa. Finzelberg, Andernach
- Extr. Hippocastani e sem. sicc., Muster-Nr. 144/6,
Fa. Birkenweg, Kleinostheim
- Extr. Primulae sicc., Muster-Nr. 863/5,
Fa. Birkenweg, Kleinostheim
- Extr. Primulae aq. sicc., Muster-Nr. 865/5,
Fa. Birkenweg, Kleinostheim
- Extr. Primulae veris sicc., aus selbstgesammelter Droge
(Deutschland)
- Extr. Primulae elat.sicc., aus selbstgesammelter Droge
(Deutschland)
- Extr. Hederae helicis e fol. sicc., 7 : 1,
Muster-Nr. 145/6, Fa. Birkenweg, Kleinostheim
- Extr. Fol. Hederae sicc., Muster-Nr. 631/85,
Fa. Engelhard, Frankfurt
- Extr. Fol. Hederae sicc., Muster-Nr. 818/84,
Fa. Engelhard, Frankfurt
- Extr. Fol. Hederae sicc., KE Ch. 25, Fa. Engelhard,
Frankfurt
- Extr. Fol. Hederae sicc., ohne nähere Bezeichnung,
Fa. Engelhard, Frankfurt

1.3 Fluidextrakte und Tinkturen

- Tinctura Primulae 1 : 5, Erg. B. 6, Muster-Nr. 864/5,
Fa. Birkenweg, Kleinostheim
- Extr. Primulae fld., Ch.-Nr. 1130432, Fa. Finzelberg,
Andernach
- Extr. Hederae fld., Ch.-Nr. 1502 530, Fa. Finzelberg,
Andernach

1.4 Fertigarzneimittel

- Venostasin^R- Tropfen, Ch.-Bez. 462161, Fa. Klinge, München
- Vasotonin^R- Tropfen, Ch.-Bez. 30701, Fa. Merz Pharma, Frankfurt
- Aesculus hippocastanum Urtinktur, Ch.-Bez. 23841, DHU, Karlsruhe
- Venoplant retard^R- Dragees, Fa. Schwabe, Karlsruhe
- Venostasin^R- Gel, Ch.-Bez. 09397, Fa. Klinge, München
- Reparil^R- Gel, Ch.-Bez. 410455, Fa. Madaus, Köln
- Expectysat Bürger^R- Tropfen, Ch.-Bez. 8518, Fa. Bürger, Bad Harzburg
- Prospan^R- Tropfen, Ch.-Bez. 12034, 42100, 39115, 21085, 36119, 08025, Fa. Engelhard, Frankfurt

1.5 Vergleichssubstanzen

- β -Aescine, Firmen Madaus (Köln), Roth (Karlsruhe), Riedel de Haen (Hannover), Institutssammlung
- Protoaescigenin, Fa. Madaus (Köln)
- Primulaverin, Prof. Dr. Thieme, Leipzig
- 5- u. 4-Methoxysalicylsäure, Sigma Chemie, Taufkirchen
- Oleanolsäure u. Hederagenin, Institutssammlung
- Monosaccharide, Testset der Fa. Merck, Darmstadt
- Rutin, Merck, Darmstadt
- Chlorogensäure u. Isochlorogensäuren, Institutssammlung
- Protocatechusäure, Roth, Karlsruhe

2. CHEMISCHE METHODEN

2.1 Hydrolysen

2.1.1 Mikrohydrolyse mit HCl-Dampf (97)

Nach dem Auftragen des Glykosids auf eine DC-Platte wurde diese in eine Glaskammer gestellt, in der sich ein Schälchen mit konzentrierter Salzsäure befand. Die Platte darf nicht direkt mit der Säure in Berührung kommen. Die Kammer wurde 20 - 30 min in einen Trockenschrank bei 100°C gestellt. Nach dem Herausnehmen der Platten wurden diese etwa 60 min abgefönt. Anschließend wurde in einem Zucker- oder Aglykonlaufmittel entwickelt.

2.1.2 Trifluoressigsäure-Hydrolyse

1-2 mg Primulasaponin 1 bzw. 2 wurde mit 2.5 ml 2N-TFA versetzt und 2 h im geschlossenen Spitzkölbchen auf dem Dampfbad erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter wiederholter Zugabe von Wasser eingeeengt bis die Lösung neutral reagierte. Zur DC-Untersuchung der Aglykone wurde der Rückstand in Chloroform aufgenommen.

2.1.3 Enzymatische Hydrolyse

1 mg Primulasaponin wurde in 2 ml Acetatpuffer (50 mmol, pH 5.2) gelöst, mit 0.2 ml Enzymsuspension aus *Helix pomatia* (Sigma-Chemie, Deisenhofen, Art.-Nr. G0876) versetzt und über 3 Tage auf 37 - 40°C gehalten. Die entstandenen Aglykone wurden mit 2 ml Chloroform ausgeschüttelt und durch DC aufgetrennt. Es waren nur sehr geringe Mengen an freigesetztem Aglykon nachweisbar.

2.1.4 Partialhydrolyse

1 mg Primulasaponin 2 wurde im verschlossenen Spitzkölbchen mit 1 ml 0.5N TFA versetzt und 30 min auf dem Dampfbad erhitzt. Um die TFA zu entfernen wurde anschließend mehrmals mit Methanol eingeengt. Der in Methanol aufgenommene Rückstand wurde zur DC in die rechte untere Ecke einer HPTLC-Platte aufgetragen und im Laufmittel DC TS 1 entwickelt. Die abgefönte Platte wurde nach 2.1.1 weiterbehandelt und danach in um 90° gedrehter Richtung ein zweites Mal entwickelt (DC TS 2). Die Detektion erfolgte mit Diphenylaminophosphorsäure-Reagenz.

2.2 Derivatisierungen

2.2.1 Darstellung der Alditolacetate (124)

Das nach 2.1.2 vorbehandelte Saponin wurde in 5 ml Wasser gelöst und mit ca. 5 mg NaBH_4 (bis zur alkalischen Reaktion) versetzt. Nach 2-stündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurden zur Zerstörung des überschüssigen NaBH_4 2 ml Eisessig zugesetzt und die Lösung zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde dreimal mit 3 ml Methanol und 2 ml Essigsäure versetzt und jeweils zur Trockene eingeengt. Nach Zusatz von 1 ml einer Mischung aus Pyridin und Acetanhydrid (1:1) wurde 1 h am Dampfbad erhitzt. Durch wiederholtes Einengen zur Trockene mit Toluol wurde die entstandene Essigsäure entfernt. Der Rückstand wurde schließlich in 3 ml Dichlormethan aufgenommen, dreimal mit wenig Wasser ausgeschüttelt und zur Trockene einrotiert. Zur GC-Bestimmung wurde die Probe in 20 - 50 μl Dichlormethan gelöst.

2.2.2 Permethylierung (126)

Etwa 2 mg Saponin wurden in einem 10 ml-Injektionsfläschchen in 2 ml trockenem DMSO (Molekularsieb 4 Å) gelöst, wobei das Fläschchen vor der Verschlüßung mit N₂ gesättigt wurde. Anschließend wurde über eine Injektionsnadel 2 ml Natrium-methylsulfinyl-methanid zugetropft, der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur in ein Ultraschallbad gestellt und über Nacht ebenfalls bei Raumtemperatur aufbewahrt. Unter Eiskühlung wurde nun tropfenweise 1.5 ml Methyljodid zugegeben, wobei eine zweite Nadel für den Druckausgleich sorgte. Die Probe wurde dann für 1 h in das Ultraschallbad gestellt, anschließend in einen Spitzkolben überführt und im Vakuum bei 40°C von überschüssigem Methyljodid befreit. Das Reaktionsgemisch wurde nun mit 10 ml Wasser versetzt und viermal mit 3 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten Dichlormethanphasen wurden durch fünfmaliges Ausschütteln mit je 5 ml Wasser vom DMSO befreit und dann zur Trockene eingengt.

2.2.3 Darstellung der methylierten Alditolacetate

Die nach 2.2.2 vorbehandelte Probe wurde nach 2.1.2 hydrolysiert und anschließend nach 2.2.1 reduziert und acetyliert. Bei der Reduktion wurde jedoch statt Na-borhydrid Na-bordeuterid verwendet.

3. ISOLIERUNGEN

3.1 Isolierung von Primulasaponin 1 und 2

50 mg Trockenextrakt wurden wie in 4.5.4.1 beschrieben vorgereinigt und etwa 1.5 ml der Lösung auf eine Kieselgel-G-Fertigplatte 0.5 mm (Merck) aufgetragen, die dreimal vorentwickelt worden war (Methanol, Methanol 80%,

Chloroform/Methanol 1:1). Die Platte wurde im Laufmittel DC TS 1 entwickelt und die Saponine durch Besprühen eines schmalen Randstreifens mit Komarowsky-Reagenz detektiert. Die abgeschabten Zonen ($R_f = 0.48$ und 0.38) wurden dreimal unter Rühren (Magnetrührer) mit Methanol eluiert, die Lösung filtriert (G4-Fritte, Membranfilter) und zur Trockene eingengt. Die in 2 ml Wasser gelöste Substanz wurde durch eine zuerst mit 2 ml Methanol, dann mit 2 ml Wasser gespülte Sep-Pak- C_{18} -Kartusche (Waters) gespritzt. Dann wurden weitere 2 ml Wasser durch die Kartusche gespritzt und anschließend die auf der Kartusche haftenden Substanzen mit Methanol eluiert. Ausbeute pro Platte 1 - 2 mg.

Für alle Arbeitsgänge (auch Vorentwicklung) wurden Lösungsmittel von p.a.-Qualität verwendet.

3.2 Isolierung von Primverin (163)

100 g fein gepulverte Droge (Fa. Galke, Ch.-Bez. 947/4) wurden 24 h mit Ethanol am Soxhlet extrahiert. Der Extrakt wurde am Vakuum zur Trockene eingengt, in 200 ml Wasser suspendiert und filtriert. Die Lösung wurde mit 50 g Polyamid (MN-Polyamid SC 6, Macherey & Nagel, $0.05 - 0.16$ mm) versetzt und geschüttelt. Nach erneuter Filtration wurde zehnmal mit 50 ml Ethylacetat/Butanol 9 : 1 ausgeschüttelt. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand so oft mit 5 ml Ethylacetat p.a. extrahiert, bis über DC (DC TS 1) keine fluo-reszenz-mindernde Zone mehr nachweisbar war. Die vereinigten Extrakte wurden zur Trockene eingengt und in wenig Methanol p.a. gelöst. Nach Membranfiltration wurden je $100 - 200 \mu\text{l}$ dieser Lösung zur HPLC (TS 9) eingespritzt. Der Hauptpeak bei $R_t = 12$ min wurde aufgefangen. Die erhaltene Fraktion wurde zur Trockene eingengt (Ausbeute ca. 2 mg).

3.3 Isolierung von Hederacosid C, α -Hederin sowie Hederasaponin X

Ausgangsmaterial war ein handelsüblicher Trockenextrakt (Fa. Birkenweg), der ca. 7% Hederacosid C und 1% α -Hederin enthielt.

3.3.1 Hederacosid C

100 g Trockenextrakt wurden in 1.5 l Wasser gelöst und dreimal mit je 1 l n-Butanol ausgeschüttelt. Nach dem Einengen der vereinigten Fraktionen verblieben 25 g bräunlicher Rückstand. Dieser wurde in etwas Methanol gelöst und in 2 l Ether eingetropft. Der erhaltene Niederschlag wurde noch zweimal gefällt (Ausbeute: 8 g Etherfällung).

Ca. 1 g der Etherfällung wurde in 5 ml Wasser gelöst und die Lösung auf eine vorbereitete Sephadex G15-Säule (Pharmacia, Uppsala) mit einem Innendurchmesser von etwa 2.5 cm und einer Füllhöhe des vorgequollenen Gels von 30 cm (Gelbettvolumen: 150 ml) aufgegeben. Es wurde mit Wasser eluiert. Der Hauptteil der Saponine wurde als Gemisch im Ausschlußvolumen eluiert. Bei diesem Geltyp und Säulenvolumen beträgt das Ausschlußvolumen etwa 50 ml. Die ersten 30 ml Eluat wurden verworfen. Anschließend wurden Fraktionen von je 2 ml aufgefangen. Die ersten 15 Fraktionen enthielten nach DC-Untersuchung ein Saponingemisch in stark angereicherter Form. Die folgenden Fraktionen waren bereits durch andere Verbindungen verunreinigt. Durch Zusammenfassung und Einrotieren der entsprechenden Fraktionen erhielten wir 180 mg einer grau-gelb gefärbten Substanz. 80 mg dieser Substanz wurden in 2 ml 80%igem Methanol gelöst. Jeweils 50 μ l dieser Lösung wurden zur HPLC (TS 12) eingespritzt und das Hederacosid C aufgefangen.

Retentionszeit: 22 min

Ausbeute pro Einspritzung: ca. 0.5 mg

Die vereinigten Fraktionen wurden eingeengt, bis nur noch eine wäßrige Lösung vorlag, und diese dann gefriergetrocknet.

3.3.2 α -Hederin

80 mg durch Sephadex vorgereinigtes Saponingemisch wurde mit 5 ml 0.1N KOH 1 h am Rückfluß hydrolysiert. Dabei erhält man quantitativ α -Hederin. Das Reaktionsgemisch wurde mit 1N HCl neutralisiert und bis zu 200 μ l dieser Lösung zur HPLC (TS 13) eingespritzt.

Retentionszeit: 13 min

Ausbeute pro Einspritzung: ca. 0.5 mg

3.3.3 Saponin X

Saponin X wurde bei der semipräparativen HPLC (TS 12) von Hederacosid C als Nebenprodukt durch Auffangen eines Peaks bei $R_t = 26$ min gewonnen. Die Ausbeute betrug etwa 4 mg.

3.4 Isolierung von Fraktionen aus β -Aescin

Je 35 μ l einer methanolischen Lösung von β -Aescin (Madaus) (10 mg/ml) wurden zur HPLC (TS 5) eingespritzt und die beiden Hauptpeaks (s. Abb. 20) aufgefangen. Die erhaltenen Fraktionen wurden am Vakuum von Acetonitril befreit und anschließend gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug etwa 3 mg für Fraktion A/B und 2 mg für Fraktion C/D.

3.5 Isolierung von Fraktionen aus Deacylaescin

20 mg β -Aescin (Madaus) wurden nach 4.5.3.1 alkalisch hydrolysiert und nach aufgearbeitet. Von dieser Lösung wurden jeweils 100 μ l zur HPLC (TS 6) eingespritzt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden am Vakuum von Acetonitril

befreit und anschließend gefriergetrocknet. Die Ausbeuten betrugen ca. 5 mg für Fraktion 3 und 0.5 mg für Fraktion 4/5/6 (30 Einspritzungen).

4. CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN

4.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

4.1.1 Adsorbentien

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC-Platten), 10 x 10 cm, Merck, Darmstadt

4.1.2 Laufmittelsysteme

Allgemeines Saponinlaufmittel

DC TS 1: Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser 60:32:12:8

Zuckerlaufmittel

DC TS 2: Chloroform-Methanol-Wasser 64:40:8

Sapogeninlaufmittel

DC TS 3: Dichlormethan-Ethylacetat-Methanol 10:3:4

DC TS 4: Toluol-Aceton 9:1

DC TS 5: Pentan-Eisessig 9:1

DC TS 6: Toluol-Aceton 8:2

4.1.3 Detektionsmittel

Saponine und Sapogenine

Komarowsky-Reagenz: 10 Teile 4-Hydroxybenzaldehyd-Lösung (2% in Methanol) werden kurz vor Gebrauch mit 1 Teil 50%iger wäßriger Schwefelsäure versetzt und vermischt. Nach dem Besprühen wird 5 – 10 min auf 110°C erhitzt. Die Saponine und Sapogenine färben sich blau (Aesculus, Primula) bzw. grün (Hedera).

Nilblau-Reagenz: 25 mg Nilblauchlorid (Merck) werden in 1.0 l Methanol gelöst und mit 1 ml 2N NaOH versetzt. Die DC-Platte wird mit dieser Lösung kräftig besprüht, abgeköhlt und anschließend über ein Dampfbad gehalten. Die Saponine erscheinen als weiße Zonen auf hellblauem Grund.

Zucker

2 g Diphenylamin, 2 g Anilin und 10 ml 85%ige Phosphorsäure werden gemischt und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt. Nach dem Besprühen wird die DC-Platte ca. 10 min auf 110°C erhitzt.

Phenolglykoside

Nach dem Besprühen mit konz. Schwefelsäure wird 10 min bei 100 °C erhitzt. Die Phenolglykoside erscheinen als rotbraune Zonen.

4.2 Präparative Dünnschichtchromatographie

siehe Isolierung der Primulasaponine (3.1)

4.3 Gelchromatographie

siehe Isolierung von Hederacosid C (3.3.1)

4.4 Gaschromatographie

Trennung von Alditolacetaten

Gerät: Perkin Elmer 900
Trärgas: Argon, 30 ml/min
Detektor: FID
Temperatur: Detektor und Einspritzblock 250°C
Schreiber: Perkin Elmer 56, Papiervorschub 5 mm/min
Säule: Glas, 6 ft x 2mm,
GP 3% SP-2330 auf 100/120 Supelcoport
Säulentemperatur: 225°C isotherm

4.5 Hochdruckflüssigchromatographie

4.5.1 Apparative Daten

- a) Liquid Chromatograph HP 1090 mit HP 1040A Photodiodenarray-Detektor, HP 85B Tischcomputer, HP 9121 Diskettenlaufwerk, HP 7470A Plotter und HP 3392A Integrator (Hewlett-Packard, Waldbronn)
- b) Pumpen: M 6000 A (Waters, Eschborn)
Gradientenprogrammer: M 660 (Waters)
Detektor: LC 75 (Perkin Elmer)
Einspritzteil: WISP 710 B (Waters)
Integrator: M 730 (Waters)
- c) Pumpen: Perkin Elmer Serie 3 B
Einspritzteil: U 6 K (Waters)
Detektor: Schoeffel SF 770 Spektralphotom.

4.5.2 Trennsysteme

Alle Trennungen wurden - wenn nicht anders angegeben - bei Raumtemperatur ausgeführt.

TS 1 : Trennung von β -Aescin, Roßkastanienextrakten und -zubereitungen

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 μ m),
125 x 4 mm ID, Merck, Darmstadt
Fließmittel: Acetonitril - Wasser 35 : 65
jeweils unter Zusatz von 10 ml 0.1N H_3PO_4 /l
Flow: 1.0 ml/min
Detektion: 210 nm

TS 2: Trennung von β -Aescin

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 μ m),
125 x 4 mm ID, Merck, Darmstadt
Fließmittel: Methanol - Wasser 65 : 35
Flow: 1.0 ml/min
Detektion: 210 nm

TS 3: Trennung von β -Aescin

Säule: Hibar LiChrosorb DIOL (5 μ m)
250 x 4 mm ID, Merck, Darmstadt
Fließmittel: Acetonitril - Wasser 92 : 8
Flow- 1.0 ml/min auf 2.5 ml/min in 10 min
programm: linearer Anstieg
Detektion: 210 nm

TS 4: Trennung der alkal. Hydrolysate von β -Aescin und Extrakten

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 μ m),
125 x 4 mm ID, Merck, Darmstadt
Fließmittel: A: Wasser B: Acetonitril
jeweils unter Zusatz von 10 ml 0.1N H_3PO_4 /l
Gradient: von 22% B auf 28% B in 10 min,
linearer Anstieg
Flow: 1.0 ml/min
Detektion: 200 nm

TS 5: Semipräparative Trennung zur Isolierung von
Fraktionen aus β -Aescin

Säule: μ -Bondapak C₁₈ (10 μ m), 300 x 7 mm ID,
Waters, Eschborn
Fließmittel: Acetonitril - Wasser 38.5 : 61.5
jeweils unter Zusatz von 10 ml 0.1N H₃PO₄/l
Flow: 3 ml/min
Detektion: 210 nm

TS 6: Semipräparative Trennung zu Isolierung von
Fraktionen aus Deacylaescin

Säule: μ -Bondapak C₁₈ (10 μ m), 300 x 7 mm ID,
Waters, Eschborn
Fließmittel: Acetonitril - Wasser 25 : 75
Flow: 3 ml/min
Detektion: 200 nm

TS 7: Trennung der Saponine in Primulae-radix-Extrakten
und -Zubereitungen

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 μ m),
125 x 4 mm ID, Merck, Darmstadt
Fließmittel: A: Wasser B: Acetonitril
jeweils unter Zusatz von 10 ml 0.1N H₃PO₄/l
Gradient: 30% B auf 50.5% B in 25 min,
linearer Anstieg
Flow: 1.0 ml/min
Detektion: 195 nm
Säulentemp.: 22°C

TS 8: Trennung der Phenolglykoside

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 μ m),
125 x 4 mm ID, Merck, Darmstadt
Fließmittel: A: Wasser B: Acetonitril
jeweils unter Zusatz von 10 ml 0.1N H₃PO₄/l
Gradient: 10% B auf 25% B in 10 min,
linearer Anstieg
Flow: 1.0 ml/min
Detektion: 240 nm

TS 9: Semipräparative Trennung zur Isolierung von
Primverin

Säule: LiChrosorb RP 18 (7 μ m), 250 x 10 mm ID,
Merck, Darmstadt
Fließmittel: Acetonitril - Wasser 18 : 82
Flow: 4.5 ml/min
Detektion: 254 nm

TS 10: Trennung der Phenolglykoside und deren Aglykone

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 μ m),
125 x 4 mm ID, Merck, Darmstadt
Fließmittel: A: Wasser B: Acetonitril
jeweils unter Zusatz von 10 ml 0.1N H_3PO_4 /l
Gradient: 15% B auf 55% B in 25 min, linearer Anstieg
Flow: 1.0 ml/min
Detektion: 209 nm

TS 11: Trennung der Saponine in Hedera-helix-Extrakten
und -Zubereitungen

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 μ m),
125 x 4 mm ID, Merck, Darmstadt
Fließmittel: A: Wasser B: Acetonitril
jeweils unter Zusatz von 10 ml 0.1N H_3PO_4 /l
Gradient: zweistufiger Gradient:
22% B auf 32% B in 10 min,
32% B auf 54% B in 15 min,
jeweils linearer Anstieg
Flow: 1.0 ml/min
Detektion: 205 nm

TS 12: Trennung von Kaffeesäurederivaten und Rutin

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 μ m),
125 x 4 mm ID, Merck, Darmstadt
Fließmittel: A: Wasser B: Acetonitril
jeweils unter Zusatz von 10 ml 0.1N H_3PO_4 /l
Gradient: 5% B auf 30% B in 30 min,
linearer Anstieg
Flow: 1.0 ml/min
Detektion: simultan bei 254, 325 und 380 nm

TS 13: Semipräparative Trennung zur Isolierung von
Hederacosid C und Hederasaponin X

Säule: LiChrosorb RP18, 250 x 10 mm ID, 7 μ m
Fließmittel: Acetonitril - Wasser 32 : 68
Flow: 2,5 ml/min
Detektion: 205 nm

TS 14: Semipräparative Trennung zur Isolierung von
 α -Hederin

Säule: LiChrosorb RP18, 250 x 10 mm ID, 7 μ m
Fließmittel: Acetonitril - Wasser 47 : 53
Flow: 3,5 ml/min
Detektion: 205 nm

4.5.3 Qualitative und quantitative Analyse von Hippocastani semen

4.5.3.1 Probenvorbereitung

Fingerprintanalyse

β -Aescin:

10 mg kristallines β -Aescin des Handels werden im 5 ml-Meßkölbchen mit 1.0 ml Standardlösung (15 mg PHB-Ethylester, Methanol p.a. ad 100.0 ml) versetzt und mit Methanol p.a. auf 5.0 ml aufgefüllt.

Droge:

1 g der fein gepulverten Droge wird dreimal mit je 10 ml 60%igem Methanol 15 min unter Rückfluß erhitzt. Die vereinigten Extrakte werden nach dem Abkühlen in einen 50 ml-Meßkolben filtriert und aufgefüllt. 10 ml dieser Lösung werden in einem Spitzkölbchen mit 1 ml Standardlösung versetzt und vorsichtig im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird im Kölbchen in 4 ml 30%igem Methanol gelöst und langsam durch eine Sep-Pak- C_{18} -Kartusche (Waters) gespritzt, die vorher mit 2 ml Methanol p.a., dann mit 2 ml 30%igem Methanol gespült wurde. Der Inhalt des Spitzkölbchens wird dreimal mit insgesamt 2 ml 30%igem Methanol gewaschen, die Lösungen werden in die Spritze gefüllt und ebenfalls durchgespritzt. Die wäßrigen Lösungen werden verworfen. Dann werden die auf der Kartusche haftenden Substanzen mit 4 ml Methanol p.a. in ein 5 ml-Meßkölbchen eluiert. Das Meßkölbchen wird auf 5.0 ml aufgefüllt. Es ist darauf zu achten, daß keine Luft in die Kartusche gelangt, da dies zu Schaumbildung durch die Saponine führt.

Dragees:

1 Dragee (bzw. eine ca. 10 mg Saponin enthaltende Menge des verriebenen Dragees) wird mit 4 ml Methanol p.a. aufgeschlämmt und die Suspension filtriert. Der Rückstand wird noch zweimal in gleicher Weise behandelt, wobei das gleiche Filter verwendet wird. Die Geräte werden mit etwas Methanol p.a. nachgespült und diese Spüllösung ebenfalls durch das Filter gegeben. Das klare Filtrat wird nach Zusatz von 1 ml Standardlösung im Spitzkölbchen im Vakuum zur Trockene eingeengt. Weiteres Vorgehen wie oben beschrieben.

Flüssigpräparate:

Eine etwa 10 mg Saponin enthaltende Menge der Tropfen wird im Spitzkölbchen zusammen mit 1 ml Standardlösung im Vakuum zur Trockene eingeengt. Weiteres Vorgehen wie oben beschrieben.

Bestimmung des Gesamtsaponingehaltes

Eichlösung:

8 bis 10 mg kristallines β -Aescin (genau gewogen) werden mit 10 ml 0.1 N-KOH versetzt. Man erhitzt genau 15 min unter Rückfluß. Die abgekühlte Reaktionslösung wird direkt durch eine Sep-Pak-Kartusche gespritzt, die vorher mit 2 ml Methanol p.a. und anschließend mit 2 ml Wasser gespült wurde. Der Kolben wird dreimal mit insgesamt 2 ml Wasser nachgespült und die Spüllösungen ebenfalls durch die Kartusche gespritzt. Die wäßrigen Lösungen werden verworfen. Anschließend werden die auf der Kartusche verbliebenen Substanzen mit 4 ml Methanol p.a. in ein 5 ml-Meßkölbchen eluiert, das bereits 1.0 ml Standardlösung (20 mg PHB-Methylester, Methanol p.a. ad 100.0 ml) enthält. Nach Auffüllen auf 5.0 ml erhält man die fertige Eichlösung.

Droge:

Die Droge wird wie oben beschrieben extrahiert, die vereinigten Extrakte in einen 50 ml-Meßkolben filtriert und mit Methanol p.a. auf 50.0 ml aufgefüllt. 10.0 ml dieser Lösung werden im Vakuum zur Trockene eingengt. Weiteres Vorgehen siehe Eichlösung.

Flüssigpräparate:

Eine etwa 10 mg Saponin enthaltende Menge der Extrakte/Tropfen (ca. 1 ml) wird im Vakuum zur Trockene eingengt und, wie bei der Eichlösung beschrieben, weiterbehandelt.

Dragees:

Eine etwa 10 mg Saponin enthaltende Menge der verriebenen Dragees wird wie oben beschrieben extrahiert und filtriert. Nach dem Einengen des Filtrats geht man wie bei der Bereitung der Eichlösung vor.

Die Einspritzmengen bei den qualitativen und quantitativen Analysen betragen jeweils 10 μ l.

4.5.3.2 Angaben zur quantitativen Bestimmung

Standardkorrekturfaktor:

Die Bestimmung erfolgte über die Methode des inneren Standards. Durch fünfmaliges Einspritzen der Eichlösung wurde für hydrolysiertes β -Aescin ein Standardkorrekturfaktor nach folgender Formel ermittelt.

$$f = \frac{F(\text{Su})}{F(\text{St})} \cdot \frac{E(\text{St})}{E(\text{Su})}$$

$F(\text{Su})$ = Summe der Peakflächen (Peak 1-6)
von hydroly. β -Aescin
 $F(\text{St})$ = Peakfläche des Standards
 $E(\text{Su})$ = Einwaage an β -Aescin
 $E(\text{St})$ = Einwaage des Standards

$$f(\text{hydrolysiertes } \beta\text{-Aescin}) = 4.772 \cdot 10^{-2}$$

Eichgeraden, Linearität, Nachweisgrenze:

Durch Einspritzen verschiedener Mengen der Eichlösung wurden Eichgeraden erstellt und die Linearität der Abhängigkeit zwischen Peakfläche und eingespritzter Menge überprüft.

	Hydrol. β -Aescin	Standard
Regressionsgerade ¹ :	$y = -0.59 + 0.93x$	$y = 0.074 + 18.169x$
Korrelationskoeffizient:	0.999	1.000
linearer Bereich:	5 - 25 μg	0.1 - 0.8 μg
Nachweisgrenze ² :	ca. 0.4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$	ca. 0.01 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$

¹y-Achse: Flächeneinheiten $\cdot 10^6$

x-Achse: eingespritzte Menge in μg

²Menge bei der die Grenze der Integrierbarkeit (10^5 FE) erreicht ist.

Wiederfindungsrate: 100.9 %

Reproduzierbarkeit (Standardabweichungen, 5 Versuche):
0.35 - 2.70 %

4.5.4 Qualitative und quantitative Analyse von *Primulae radix*

4.5.4.1 Probenvorbereitung

Saponinanalyse

Eichlösung:

Je 5 mg Primulasaponin 1 und 2 (genau gewogen) werden in 5 ml-Meßkölbchen mit 1.0 ml Standardlösung (10 bis 15 mg PHB-Propylester [Sigma, Taufkirchen], Methanol p.a. ad 100.0 ml) versetzt und mit Methanol p.a. auf 5.0 ml aufgefüllt.

Droge:

Die genau gewogene, fein gepulverte Droge (Sieb 6) wird dreimal mit der zehnfachen Menge Methanol p.a. 15 min lang unter Rückfluß erhitzt. Die vereinigten Extrakte werden im Vakuum zur Trockene eingengt und die Extrakt- ausbeute bestimmt. Weiteres Vorgehen siehe Trockenex- trakte.

Fluidextrakte und Tinkturen:

0.5 bis 1 ml Fluidextrakt bzw. Tinktur werden im Spitz- kölbchen zusammen mit 1 ml Standardlösung im Vakuum zur Trockene eingengt. Weiteres Vorgehen siehe Trockenex- trakte.

Trockenextrakte:

40 bis 50 mg Trockenextrakt (vakuumgetrocknet, genau gewogen) werden im Spitzkölbchen mit 1.0 ml Standard- lösung versetzt und im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird im Kölbchen mit 2 ml 10%igem Methanol gelöst (evtl. Ultraschallbad) und langsam durch eine Sep-Pak-C₁₈-Kartusche (Waters) gespritzt, die vorher zuerst mit 2 ml Methanol p.a., dann mit 2 ml 10%igem Methanol gespült wurde. Das Kölbchen wird dreimal mit insgesamt 2 ml 10%igem Methanol nachgespült, die Lösungen werden ebenfalls in die Spritze gefüllt und durchge- spritzt. Die wäßrigen Lösungen werden verworfen. Dann werden die auf der Kartusche haftenden Substanzen mit 4 ml Methanol p.a. in ein 5 ml-Meßkölbchen eluiert und auf 5.0 ml aufgefüllt. Sollte die Probe trüb sein, muß eine Membranfiltration durchgeführt werden.

Analyse der Phenolglykoside

40 bis 50 mg Trockenextrakt werden im Spitzkölbchen in 2 ml Methanol p.a. gelöst und durch eine Sep-Pak-C₁₈-Kartusche, die vorher mit 2 ml Methanol p.a. gespült wurde, in ein 5 ml-Meßkölbchen gespritzt. Das Spitzkölbchen wird dreimal mit insgesamt 2 ml Methanol p.a. nachgespült, die Spüllösungen werden ebenfalls durch die Kartusche in das Meßkölbchen gespritzt. Dann wird auf 5.0 ml aufgefüllt.

Die Einspritzmengen bei den qualitativen und quantitativen Analysen betragen jeweils 10 µl.

4.5.4.2 Angaben zur quantitativen Bestimmung

Standardkorrekturfaktor:

Die Bestimmung erfolgte über die Methode des inneren Standards. Durch fünfmaliges Einspritzen der Eichlösung wurden für Primulasaponin 1 und 2 Standardkorrekturfaktoren nach der in 4.5.3.2 aufgeführten Formel ermittelt.

$$f(\text{Primulasaponin 1}) = 5.0774 \cdot 10^{-3}$$

$$f(\text{Primulasaponin 2}) = 4.8360 \cdot 10^{-3}$$

Eichgeraden, Linearität, Nachweisgrenzen:

Durch Einspritzen verschiedener Mengen der Eichlösung wurden Eichgeraden erstellt und die Linearität der Abhängigkeit zwischen Peakfläche und eingespritzter Menge überprüft.

	Primulasap. 1	Primulasap. 2	Standard
Regressionsgerade ¹	$y=0.842+0.913x$	$y=0.425+0.817x$	$y=0.042+18.33x$
Korrelationskoeffizient	0.995	0.995	1.000
linearer Bereich	2-15 µg	2-15 µg	0.02-0.4 µg
Nachweisgrenze ²	0.3 µg/10 µl	0.6 µg/10 µl	0.01 µg/10 µl

¹y-Achse: Flächeneinheiten · 10⁵ (Standard 10⁶)

²x-Achse: eingepirzte Menge in µg

²Menge bei der die Grenze der Integrierbarkeit (10⁵ FE) erreicht ist.

Reproduzierbarkeit (Standardabweichung, 5 Versuche):

0.32 - 2.72 %

4.5.5 Qualitative und quantitative Analyse von Hederae folium

4.5.5.1 Probenvorbereitung

Eichlösung:

5 mg Hederacosid C und 5 mg α-Hederin (genau gewogen) werden im 5 ml-Meßkölbchen mit 1.0 ml Standardlösung (10-15 mg p-Hydroxybenzoesäurepropylester, Methanol p.a. ad 100.0 ml) versetzt und mit Methanol p.a. auf 5.0 ml aufgefüllt.

Drogen:

Die fein gepulverte Droge (5-10 g genau gewogen) wird dreimal mit der zehnfachen Menge Methanol p.a. 15 min am Rückfluß extrahiert. Die Extrakte werden eingengt. Die Extraktausbeute wird bestimmt. Weiteres Vorgehen siehe Trockenextrakte.

Trockenextrakte:

Ca. 40 mg Trockenextrakt (vakuumgetrocknet, genau gewogen) werden im Spitzkölbchen mit 1.0 ml Standardlösung und 1 ml Methanol p.a. versetzt und möglichst vollständig gelöst (evtl. Ultraschallbad). Die Lösung wird mit einer Spritze durch eine am Einlaß mit etwas Watte versehene Sep-Pak-C₁₈-Kartusche (Waters), die vorher mit 2 ml Methanol p.a. gespült wurde, in ein 5 ml-Meßkölbchen gespritzt. Das Spitzkölbchen wird dreimal mit insgesamt 2 ml Methanol p.a. gewaschen und die Lösungen ebenfalls durch die Kartusche in das Meßkölbchen gespritzt. Dann wird mit Methanol p.a. durch die Kartusche bis zur Marke aufgefüllt.

Flüssigarzneimittel:

2.0 ml Präparat werden mit 1.0 ml Standardlösung versetzt und zur Trockene eingengt. Weiteres Vorgehen siehe Trockenextrakte.

Die Einspritzmengen bei den qualitativen und quantitativen Analysen betrugen jeweils 10 µl.

4.5.5.2 Angaben zur quantitativen Bestimmung

Standardkorrekturfaktor:

Die Bestimmung erfolgte über die Methode des inneren Standards. Durch fünfmaliges Einspritzen der Eichlösung wurden für Hederacosid C und α-Hederin Standardkorrekturfaktoren nach der in 4.5.3.2 angegebenen Formel ermittelt.

Für Saponin X wurde nach der Formel

$$f(\text{Saponin X}) = f(\text{Hederacosid C}) \frac{\text{MG}(\text{Hed. C})}{\text{MG}(\text{Sap. X})}$$

ein approximativer Standardkorrekturfaktor berechnet.

$$\begin{aligned}
 f(\text{Hederacosid C}) &= 3.9899 \times 10^{-2} \\
 f(\text{Saponin X}) &= 4.5322 \times 10^{-2} \\
 f(\alpha\text{-Hederin}) &= 6.8830 \times 10^{-2}
 \end{aligned}$$

Eichgeraden, Linearität, Nachweisgrenzen:

Durch Einspritzen verschiedener Mengen der Eichlösung wurden Eichgeraden erstellt und die Linearität der Abhängigkeit zwischen Peakfläche und eingespritzter Menge überprüft.

	Hederacosid C	α -Hederin	Standard
Regressionsgerade ¹	$y=0.224+0.439x$	$y=-0.036+0.821x$	$y=0.059+11.61x$
Korrelationskoeffizient	0.999	1.000	1.000
linearer Bereich	1-20 μg	1-20 μg	0.02-0.4 μg
Nachweisgrenze ²	0.2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$	0.2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$	0.01 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$

¹y-Achse: Flächeneinheiten $\cdot 10^6$

x-Achse: eingespritzte Menge in μg

²Menge bei der die Grenze der Integrierbarkeit (10^5 FE) erreicht ist.

Reproduzierbarkeit (Standardabweichung, 5 Versuche):

	Hederacosid C	α -Hederin
nur HPLC-Analyse	0.56 - 1.91 %	1.20 - 5.00 %
mit Probenvorbehandlung	1.25 %	3.56 %

4.5.6 Integration

Die Chromatogramme wurden mit dem HP 3392A-Integrator ausgewertet. Bei Bedarf wurden zur Verbesserung der Grundlinienkonstruktion die zeitgesteuerten Funktionen "Set baseline now" bzw. "Set baseline next valley" verwendet. Auf diese Weise sind falsche Integrationswerte bei Grundlinienabfall zu Beginn eines Chromatogramms oder Grundlinienanstieg bei Gradientenelution zu vermeiden.

4.5.7 Berechnung

Der HP 3392A-Integrator verwendet zur Auswertung Responsefaktoren ($RF = \text{Menge} : \text{Fläche}$), die zum Standardkorrekturfaktor (f) in folgender Beziehung stehen:

$$f = \frac{F(\text{Su})}{F(\text{St})} \cdot \frac{E(\text{St})}{E(\text{Su})} = \frac{RF(\text{St})}{RF(\text{Su})}$$

$F(\text{Su})$ Peakfläche der zu best. Substanz
 $F(\text{St})$ Peakfläche des inneren Standards
 $E(\text{Su})$ Menge der zu best. Substanz in μg
 $E(\text{St})$ Menge des inneren Standards in μg
 $RF(\text{St})$ Responsefaktor Standard
 $RF(\text{Su})$ Responsefaktor der zu best. Substanz
 f Standardkorrekturfaktor

Daraus folgt für die Berechnung des Gehaltes:

$$E(\text{Su}) = \frac{F(\text{Su}) \cdot E(\text{St}) \cdot RF(\text{Su})}{F(\text{St}) \cdot RF(\text{St})}$$

5. SPEKTROSKOPISCHE METHODEN

5.1 Massenspektrometrie

EI-MS:

Massenspektrometer MS 30, Fa. AEI

FAB-MS:

Massenspektrometer: Kratos MS 80 RFA

FAB-Quelle: Xenon, 7 - 8 kV, 10 W

Matrix: Glycerin (bei Positiv-Ionen-Detektion Zusatz von LiCl)

Zur zweifelsfreien Identifizierung des Pseudomolekülions wurde jeweils auch ein Spektrum mit Positiv-Ionen-Detektion aufgenommen.

GC-MS:

Gerät: Kratos MFC 500 direkt gekoppelt mit Massenspektrometer Kratos MS 80 RFA

Trärgas: 0.9 ml/min Helium

Säule: OV 225 Kapillarsäule, 25 m x 0.23 mm ID

Programm: 150°C isotherm, 3 min, dann 150 - 210°C mit 5°C/min

Interface: 200°C Injektor: 220°C

Einspritzmenge: 1 µl Split: 1 : 10

Energiequelle: 70 eV

5.2 UV-Spektren

Gerät: Photodiodenarray-Detektor HP 1040A,
Fa. Hewlett-Packard

6. MESSDATEN

Primulasaponin 1: (amorphe Substanz) $C_{54}H_{88}O_{23}$
UV: Endabsorption, Grundlinie ab 235 nm
FAB-MS (neg.): m/e (rel. Int.): 1103 [M-H]⁻ (100), 957 (23), 941 (12), 795 (58), 633 (15), 599 (19), 457 (12)
HPLC (TS 7): $\frac{Rt(Primulasap.1)}{Rt(PHB-Propylester)} = 1.30$
DC: DC TS 1: Rf = 0.41
Mikrohydrolyse: Glucuronsäure, Glucose, Galaktose, Rhamnose

Primulasaponin 2: (amorphe Substanz) $C_{59}H_{96}O_{27}$
UV: Endabsorption, Grundlinie ab 235 nm
FAB-MS (neg.): m/e (rel. Int.): 1235 [M-H]⁻ (100), 1103 (10), 1089 (17), 957 (17), 941 (19), 927 (62), 795 (17), 633 (28), 457 (27)
EI-MS (permethyliertes Saponin):
m/e (rel. Int.): 472 (37), 470 (28), 379 (19), 281 (31), 276 (42), 265 (99), 263 (100), 249 (48), 233 (49), 219 (51), 217 (66), 205 (82), 203 (79), 201 (50), 191 (36), 190 (42)
HPLC (TS 7): $\frac{Rt(Primulasap.2)}{Rt(PHB-Propylester)} = 1.11$
DC: DC TS 1: Rf = 0.35
Mikrohydrolyse: Glucuronsäure, Glucose, Galaktose, Rhamnose, Xylose

α -Hederin (amorphe Substanz) $C_{41}H_{66}O_{12}$
 UV: $\lambda_{\max} = 190 \text{ nm}$, Grundlinie ab 235 nm
 FAB-MS (neg.): m/e (rel. Int.): 749 $[M-H]^-$ (40), 603 (8), 585 (6), 471 (8), 455 (5), 423 (5)

HPLC (TS 11): $\frac{Rt(\alpha\text{-Hederin})}{Rt(\text{PHB-Propylester})} = 1.37$

DC: DC TS 1: $R_f = 0.78$

Mikrohydrolyse: Hederagenin, Rhamnose, Arabinose

Hederacosid C (amorphe Substanz) $C_{59}H_{96}O_{26}$
 UV: $\lambda_{\max} = 190 \text{ nm}$, Grundlinie ab 235 nm
 FAB-MS (neg.): m/e (rel. Int.): 1219 $[M-H]^-$ (15), 1073 (5), 749 (100), 603 (18), 469 (22), 452 (14), 422 (14)

HPLC (TS 11): $\frac{Rt(\text{Hederacosid C})}{Rt(\text{PHB-Propylester})} = 0.63$

DC: DC TS 1: $R_f = 0.42$

Mikrohydrolyse: Hederagenin, Rhamnose, Arabinose, Glucose

Die als Bezugssubstanzen verwendeten Saponine wurden mit DC und HPLC auf Reinheit geprüft und erwiesen sich als chromatographisch rein.

Saponin X (amorphe Substanz) $C_{53}H_{86}O_{22}$
 UV: $\lambda_{\max} = 190 \text{ nm}$, Grundlinie ab 235 nm
 FAB-MS (neg.): m/e (rel. Int.): 1073 $[M-H]^-$ (10), 603 (100), 469 (10)

HPLC (TS 11): $\frac{Rt(\text{Saponin X})}{Rt(\text{PHB-Propylester})} = 0.66$

DC: DC TS 1: $R_f = 0.46$

Mikrohydrolyse: Hederagenin, Rhamnose, Arabinose, Glucose

Primverin: $C_{20}H_{28}O_{13}$
 UV: λ_{max} 209 nm, 255 nm, 290(sh) nm
 FAB-MS (pos.): m/e (rel. Int.): 499 $[M+Na]^+$ (30), 483
 $[M+Li]^+$ (20), 183 (66), 151 (62)
 DC: DC TS 1: Rf = 0.67
 Mikrohydrolyse: 5-Methoxysalicylsäuremethylester, Xylose,
 Glucose

β -Aescin: $C_{55}H_{86}O_{24}$ ($\times 2 H_2O$) (Hauptverbindung)
 FAB-MS (neg.): m/e (rel. Int.): 1129 $[M_1-H]^-$ (100), 1113
 $[M_2-H]^-$ (13), 1099 $[M_3-H]^-$ (83), 1089 (30),
 967 (45), 951 (12), 937 (10), 927 (12)

Fraktion A/B (β -Aescin):

FAB-MS (neg.): m/e (rel. Int.): 1129 $[M_1-H]^-$ (100), 1099
 $[M_3-H]^-$ (42), 967 (28), 951 (8)

Fraktion C/D (β -Aescin):

FAB-MS (neg.): m/e (rel. Int.): 1129 $[M_1-H]^-$ (100), 1099
 $[M_3-H]^-$ (29), 967 (30), 951 (8)

Fraktion 2 (alkal. hydrol. β -Aescin):

FAB-MS (neg.): m/e (rel. Int.): 1005 $[M_1-H]^-$ (96), 975
 $[M_2-H]^-$ (47), 843 (29), 813 (12), 681 (6),
 505 (17)

Methylierungsanalyse von Primulasaponin 2 (EI-MS):

1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-6-desoxy-hexitol- d_1
 m/e (rel. Int.): 175 (38), 162 (72), 146
 (18), 131 (83), 118 (78), 115 (73), 102
 (82), 101 (52), 89 (75), 72 (69), 60
 (33), 43 (100), 32 (29)

1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-pentitol-d₁
m/e (rel. Int.): 162 (66), 161 (65), 131
(16), 130 (14), 129 (15), 117 (81), 102
(79), 101 (80), 88 (41), 87 (37), 73
(19), 60 (35), 43 (100), 32 (28)

1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl-hexitol-d₁
m/e (rel. Int.): 234 (16), 205 (22), 190
(81), 161 (90), 145 (40), 130 (88), 129
(91), 101 (45), 100 (43), 88 (48), 87
(42), 74 (15), 43 (100), 32 (35)

1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-hexitol-d₁
m/e (rel. Int.): 233 (51), 190 (18), 173
(4), 161 (27), 131 (15), 130 (27), 129
(41), 118 (72), 113 (43), 102 (26), 99
(27), 87 (30), 43 (100), 32 (33)

1,2,3,5,6-Penta-O-acetyl-4-O-methyl-hexitol-d₃
m/e (rel. Int.): 262 (20), 253 (5), 233
(5), 202 (15), 191 (53), 161 (9), 160
(9), 143 (50), 131 (100)

ANHANG

Statistische Definitionen

x_i : Meßwert

n : Anzahl der Meßwerte

$\bar{x}$: arithmetischer Mittelwert aller Meßwerte

A : Steigung der linearen Regressionskurve

$s_{x,y}$: Standardabweichung der x - bzw. y -Werte

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad : \text{Varianz mit (n-1)-Gewichtung}$$

$$s = \sqrt{S} \quad : \text{Standardabweichung}$$

$$s_{\text{rel}} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 (\%) \quad : \text{Relative Standardabweichung}$$

$$r = \frac{A \cdot s_x}{s_y} \quad : \text{Korrelationskoeffizient}$$

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) TSCHESCHE, R. und WULFF, G.: "Chemie und Biologie der Saponine", in Zechmeister, L.: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Vol. 30 (1973), S. 461-576
- 2) BOITEAU, P., PASICH, B. und RATSIMANANGA, A.R.: "Les Triterpenoides en Physiologie vegetale et animale", Gauthier-Villars, editeur 55, Paris (1964)
- 3) HILLER, K., KEIPERT, M. und LINZER, B.: Pharmazie 21, 713 (1966)
- 4) WOITKE, H.-D., KAISER, J.-P. und HILLER, K.: Pharmazie 25, 133 und 213 (1970)
- 5) HILLER, K. und VOIGT, G.: Pharmazie 32, 365 (1977)
- 6) HILLER, K. und ADLER, C.: Pharmazie 37, 619 (1982)
- 7) ADLER, C. und HILLER, K.: Pharmazie 40, 676 (1985)
- 8) GUBANOV, I.A., LIBIZOV, N.I. und GLADIKH, A.S.: Farmatsiya (Moscow) 19(3), 23 (1970)
- 9) TSCHESCHE, R. und WULFF, G.: Planta med. 12, 272 (1964)
- 10) SCHLÖSSER, E. und WULFF, G.: Z. Naturforsch. 24b, 1284 (1969)
- 11) WULFF, G.: Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 797 (1968)
- 12) TSCHESCHE, R. und WULFF, G.: Z. Naturforsch. 20b, 543 (1965)
- 13) RAO, G.S., SINSHEIMER, J.E. und COCHRAN, K.W.: J. Pharm. Sci. 63, 471 (1974)
- 14) TSCHESCHE, R., WULFF, G. und WEBER, A.: Z. Naturforsch. 25b, 999 (1970)
- 15) APPLEBAUM, S.W., MARCO, S. und BIRK, Y.: J. Agr. Food Chem. 17, 618 (1969)
- 16) HOSTETTMANN, K., KIZU, H. und TOMIMORI, T.: Planta med. 44, 34 (1982)
- 17) POWELL, J.W. und WHALLEY, W.B.: Phytochemistry 8, 2105 (1969)
- 18) JENTZSCH, K., SPIEGEL, P. und FUCHS, L.: Arzneim.-Forsch. 11, 413 (1961)
- 19) VOGEL, G.: Planta med. 11, 362 (1963)
- 20) DAVIS, A.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 31, 616 (1981)
- 21) GESTETNER, B., BIRK, Y. und BONDI, A.: Phytochemistry 5, 799 (1966)
- 22) TSCHESCHE, R., TAUSCHER, M., FEHLHABER, H.-W. und WULFF, G.: Chem. Ber. 102, 2072 (1969)
- 23) SHIBATA, S.: "Saponins with Biological and Pharmacological Activity", in Proceedings in Life Sciences (1977), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1977)
- 24) HAGERS Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Hrsg. List, P. und Hörhammer, L., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1973)
- 25) PFAU, E.: Dtsch. Apoth. Ztg. 1330, (1925)
- 26) HILLER, K. und LINZER, B.: Pharmazie 21, 245 (1966)

- 27) MÜHLEMANN, H. und SCHEIDEGGER, W.: Pharm. Acta Helv. 22, 147 (1947)
- 28) WAGNER, H. und WURMBÖCK, A.: Dtsch. Apoth. Ztg. 118, 1209 (1981)
- 29) HAMMERSTEIN, F. und KAISER, F.: Planta med. 21, 5 (1972)
- 30) FRANCK, H.-P.: Dtsch. Apoth. Ztg. 115, 1206 (1975)
- 31) GLASL, H. und IHRIG, M.: Pharm. Ztg. 129, 2619 (1984)
- 32) BESSO, H., SARUWATARI, Y., FUTAMURA, K., KUNIHIRO, K., FUWA, T. und TANAKA, O.: Planta med. 37, 226 (1979)
- 33) STICHER, O. und SOLDATI, F.: Planta med. 36, 30 (1979)
- 34) SOLDATI, F. und STICHER, O.: Planta med. 38, 348 (1980)
- 35) MEIER, B., MEIER-BRATSCHI, A., DALLENBACH-TÖLKE, K. und STICHER, O.: "Quantitative Analysis of Ginseng by HPLC", in Advances in Chinese Medicinal Materials Research, World Scientific Publ. Co., Singapore (1985)
- 36) SHIMIZU, K., AMAGAYA, S. und OGIHARA, Y.: J. Chromatogr. 268, 85 (1983)
- 37) SHIMIZU, K., AMAGAYA, S. und OGIHARA, Y.: J. Chromatogr. 307, 488 (1984)
- 38) KIMATA, H., HIYAMA, C., YAHARA, S., TANAKA, O., ISHIKAWA, O. und AIURA, M.: Chem. Pharm. Bull. 27, 1836 (1979)
- 39) STICHER, O. und SOLDATI, F.: Pharm. Acta Helv. 53 (2), 46 (1978)
- 40) KILLACKY, J., ROSS, M.S.F. und TURNER, T.D.: Planta med. 30, 310 (1976)
- 41) AKADA, Y. und TANASE, Y.: Yakugaku Zasshi 96, 1035 (1976)
- 42) MAHATO, S.B., SAHU, N.P. und ROY, S.K.: J. Chromatogr. 206, 169 (1981)
- 43) HIGGINS, J.W.: J. Chromatogr. 121, 329 (1976)
- 44) IRELAND, P.A. und DZIEDZIC, S.Z.: J. Chromatogr. 325, 275 (1985)
- 45) KITAGAWA, I., YOSHIKAWA, M., HAYASHI, T. und TANIYAMA, T.: Yakugaku Zasshi 104(3), 275 (1984)
- 46) DOMON, B., DORSAZ, A.-C. und HOSTETTMANN, K.: J. Chromatogr. 315, 441 (1984)
- 47) LIN, J.-T., NES, W.D. und HEFTMANN, E.: J. Chromatogr. 207, 457 (1981)
- 48) BURNOUF-RADOSEVICH, M. und DELFEL, N.E.: J. Chromatogr. 292, 403 (1984)
- 49) LIN, J.-T. und XU, C.J.: J. Chromatogr. 287, 105 (1984)
- 50) BERTANI, W. und FORNI, G.P.: Fitoterapia Vol. LV, No. 2, 101 (1984)
- 51) SCOTT, A.I.: "Interpretation of the UV-Spectra of Natural Products", Pergamon Press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Paris, Frankfurt (1964)
- 52) HEGI, G.: "Illustrierte Flora von Mitteleuropa", Karl Hauser Verlag, München (1958)
- 53) CAINELLI, G., MELERA, A., ARIGONI, D. und JEGER, O.: Helv. Chim. Acta 40, 2390 (1957)
- 54) KUHN, R. und LÖW, I.: Liebig's Ann. Chem. 669, 183 (1963)

- 55) TSCHESCHE, R. und WULFF, G.: Tetrahedron lett. 1546 (1965)
- 56) YOSIOKA, I., NISHIMURA, T., MATSUDA, A. und KITAGAWA, I.: Tetrahedron lett. 48, 5973 (1966)
- 58) TSCHESCHE, R., AXEN, U. und SNATZKE, G.: Liebigs Ann. Chem. 669, 171 (1963)
- 59) WAGNER, J. und BOSSE, J.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 320, 27 (1960)
- 60) WULFF, G. und TSCHESCHE, R.: Tetrahedron lett. 25, 415 (1969)
- 61) WAGNER, J. und HOFFMANN, H.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1697 (1967)
- 62) WAGNER, J. und BOSSE, J.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 322, 254 (1960)
- 63) WAGNER, J., HOFFMANN, H. und LÖW, I.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1133 (1970)
- 64) WAGNER, J., SCHLEMMER, W. und HOFFMANN, H.: Arzneim.-Forsch. 20, 205 (1970)
- 65) WAGNER, J., HOFFMANN, H. und LÖW, I.: Arch. Pharm. 304, 804 (1971)
- 66) WAGNER, J.: Arzneim.-Forsch. 17, 546 (1967)
- 67) FRIEDRICH, H. und ZERUHN, E.: Planta med. 19, 110 (1970)
- 68) BOGS, U. und BREMER, D.: Pharmazie 26, 410 (1971)
- 69) LORENZ, B. und MAREK, M.L.: Arzneim.-Forsch. 10, 263 (1960)
- 70) VOGEL, G. und UEBEL, H.: Arzneim.-Forsch. 10, 275 (1960)
- 71) PREZIOSI, P. und MANCA, P.: Arzneim.-Forsch. 15, 404 (1965)
- 72) TZONOS, T. und RIEBELING, H.: Arzneim.-Forsch. 18, 225 (1968)
- 73) HAMPEL, H., HOFRICHTER, G., LIEHN, H.D. und SCHLEMMER, W.: Arzneim.-Forsch. 20, 209 (1970)
- 74) LOCHS, H., BAUMGARTNER, H. und KONZETT, H.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 24, 1347 (1974)
- 75) EISENBURGER, R., HAMPEL, H., HOFRICHTER, G. und LIEHN, H.D.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 24, 1621 (1974)
- 76) HIAI, S., YOKOHAMA, H. und OURA, H.: Chem. Pharm. Bull. 29, 490 (1981)
- 77) HIAI, S.: "Chinese Medicinal Material and the Secretion of ACTH and Corticosteroid", in Advances in Chinese Medicinal Materials Research, World Scientific Publ. Co., Singapore (1985)
- 78) EISENBURGER, R., HOFRICHTER, G., LIEHN, H.D. und LUDWIG, E.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 26, 821 (1976)
- 79) FELIX, W.: Dtsch. Apoth. Ztg. 125, 1333 (1985)
- 80) ANNONI, F., MAURI, A., MARINCOLA, F. und RESELE, L.F.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 29, 672 (1979)
- 81) BERTI, F., OMINI, C. und LONGIAVE, D.: Prostaglandins 14, 241 (1977)
- 82) LONGIAVE, D., OMINI, C., NICOSIA, S. und BERTI, F.: Pharmacol. Res. Commun. 10, 145 (1978)
- 83) ROTHKOPF-ISCHEBECK, M., und VOGEL, G.: Lymphology 13, 47 (1980)

- 84) KRAUSE, M. und WIENERT, V.: *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 30, 703 (1970)
- 85) SZILAGYI, I.: *Planta med.* 19, 42 (1970)
- 86) SCHLEMMER, W. und KERN, D.: *Sci. Pharm.* 38, 244 (1970)
- 87) SCHLEMMER, W. und BOSSE, J.: *Arch. Pharm.* 296, 785 (1963)
- 88) SCHLEMMER, W.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 106, 1315 (1966)
- 89) BÖHME, H. und HARTKE, K.: "Kommentar zum DAB 8", S. 720, Govi-Verlag, Frankfurt (1981)
- 90) WINKLER, W.: *Arzneim.-Forsch.* 18, 1031 (1968)
- 91) KAMMERL, E. und SCHLEMMER, W.: *Pharm. Ind.* 34, 356 (1972)
- 92) VANHAELLEN, M. und VANHAELLEN-FASTRE, R.: *J. Chromatogr.* 281, 263 (1983)
- 93) LEHTOLA, T.: *Farmaceutisch Tijdschrift voor België* 61, 358 (1984)
- 94) ELGASS, H., MAUTE, A., MARTIN, R. und GEORGE, S.: *Labor-Praxis* 6, 2 (1982)
- 95) HORVATH, C.: "HPLC, Advances and Perspectives", Vol.1, Academic Press, New York (1980)
- 96) ENGELHARDT, H.: "Hochdruckflüssigkeitschromatographie", Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1975)
- 97) KARTNIG, T. und WEGSCHALDER, O.: *J. Chromatogr.* 61, 375 (1971)
- 98) NIBBERING, N.M.M.: *J. Chromatogr.* 251, 93 (1982)
- 99) BARBER, M., BORDOLI, R.S., SEDGWICK, R.D. und TYLER, A.N.: *Nature* 293, 270 (1981)
- 100) RINEHART, K.L.J.: *Science* 218, 254 (1982)
- 101) TÜMMERS, M.H.: "FAB, Eine neue leistungstarke Ionisierungsmethode für die Massenspektrometrie", Firmenschrift Vacuum Generators GmbH, Wiesbaden
- 102) BARBER, M., BORDOLI, R.S., ELLIOT, G.J., SEDGWICK, R.D. und TYLER, A.N.: *Anal. Chem.* 54, 645A (1982)
- 103) WILLIAMS, D.H., BRADLEY, C., BJØJSEN, G., SANTIKARN, S. und TAYLOR, L.C.E.: *J. Am. Chem. Soc.* 103, 5700 (1981)
- 104) DELL, A. und MORRIS, H.R.: *Carbohydr. Res.* 115, 41 (1983)
- 105) DOMON, B. und HOSTETTMANN, K.: *Helv. Chim. Act.* 66, 422 (1983)
- 106) HILLER, K., ADLER, C., GALETZKA, G., FRANKE, P., GRUNDEMANN, E. und HILLE, J.: *Pharmazie* 40, 34 (1985)
- 107) FRAISSE, D., TABET, J.C., BECCHI, H. und RAYNAUD, J.: *Biomed. and Environm. Mass Spectrom.* 13, 1 (1986)
- 108) TSCHESCHE, R. und ZIEGLER, F.: *Liebigs Ann. Chem.* 674, 185 (1964)
- 109) TSCHESCHE, R. und BALLHORN, L.: *Phytochemistry* 14, 305 (1975)
- 110) HENSENS, O.D. und LEWIS, K.D.: *Tetrahedron lett.* 51, 4639 (1965)
- 111) TSCHESCHE, R. und WIEMANN, W.: *Chem. Ber.* 110, 2407 (1977)
- 112) TSCHESCHE, R., WAGNER, R. und WIDERA, W.: *Liebigs Ann. Chem.* 993 (1983)

- 113) TSCHESCHE, R., TJOA, B.T. und WULFF, G.: Liebigs Ann. Chem. 696, 160 (1966)
- 114) KARTNIG, Th. und RI, C.Y.: Planta med. 23, 379 (1973)
- 115) THIEME, H. und WINKLER, H.J.: Pharmazie 26, 434 (1971)
- 116) GORIS, A. und FRIGOT, P.: Ann. pharm. franc. 32, 233 (1974)
- 117) BEGBIE, R. und RICHTMYER, N.K.: Carbohydr. Res. 2, 272 (1966)
- 118) KREMER, B.P.: Z. Pflanzenphysiol. 86(5), 453 (1978)
- 119) KARTNIG, Th., RI, C.Y. und WEGSCHAIDER, O.: Planta med. 21, 29 (1972)
- 120) SZILAGYI, I. und KERNOCZY, Z.: Planta med. 31, 103 (1977)
- 121) PASICH, B.: Planta med. 11, 16 (1963)
- 122) NEUWALD, F. und KLINGMÜLLER, L.: Pharm. Ztg. 107, 564 (1962)
- 123) GRUJIC-VASIC, J. und KOVAC, E.: Folia med. 15, 85 (1981)
- 124) ALBERSHEIM, P., NEVINS, D.J., ENGLISH, P.D. und KARR, A.: Carbohydr. Res. 5, 340 (1967)
- 125) BJÖRNDAL, H., HELLERQUIST, C.G., LINDBERG, B. und SVENSSON, S.: Angew. Chem. 82, 643 (1970)
- 126) HAKOMORI, S.I.: J. Biochem. (Tokyo) 55, 205 (1964)
- 127) JANSSON, P.E., KENNE, L., LIEDGEN, H. und LINDBERG, B.: Chem. Comm. (Stockholm Univ.) 8, (1976)
- 128) LUDWIG, C.: Dissertation, München (1985)
- 129) KOMORI, T., TANAKA, O. und NAGAI, Y.: Org. Mass. Spektr. 9, 744 (1974)
- 130) YAHARA, S., TANAKA, O. und KOMORI, T.: Chem. Pharm. Bull. 24, 2204 (1976)
- 131) KASAI, R., MATSUURA, K., TANAKA, O., SANADA, S. und SHOJI, J.: Chem. Pharm. Bull. 25, 3277 (1977)
- 132) MIGUCHI, R., KOMORI, T. und KAWASAKI, T.: Chem. Pharm. Bull. 24, 2610 (1976)
- 133) "Organikum", VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1977)
- 134) WAGNER, H., WIERER, M. und BAUER, R.: Planta med. 1986, 184
- 135) WAGNER, H., WIERER, M. und BAUER, R.: Poster at 34th Annual Congress on Medicinal Plant Res., Hamburg 22.-27.9.86
- 136) ENGLER, A.: "Syllabus der Pflanzenfamilien", 12. Auflage, Gebr. Bornträger Verlag, Berlin (1964)
- 137) STAHL, E.: Arch. Pharm. 306, 693 (1973)
- 138) WAGNER, H., TITTEL, G. und BLADT, S.: Dtsch. Apoth. Ztg. 123, 515 (1983)
- 139) DAIGLE, D.J. und CONKERTON, E.J.: J. Chromatogr. 240, 202 (1982)
- 140) COURT, W.A.: J. Chromatogr. 130, 287 (1977)
- 141) MÖLLER, B. und HERRMANN, K.: J. Chromatogr. 241, 371 (1982)
- 142) BRANDL, W. und HERRMANN, K.: J. Chromatogr. 260, 447 (1983)
- 143) BRANDL, W. und HERRMANN, K.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 178, 192 (1984)

- 144) MC CULLOUGH, F.S., GAYRAL, P., DUNCAN, J. und CHRISTIE, J.D.: Bull. of the WHO 58(5), 681 (1980)
- 145) BONFORD, R.: Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 67, 127 (1982)
- 146) SCOTT, M.T., GOSS-SAMPSON, M. und BOMFORD, R.: Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 77, 409 (1985)
- 147) SEGAL, R. und MILO-GOLDZWEIG, I.: Biochimica et Biophysica Acta 512, 223 (1978)
- 148) ABD EL BARY, A. und NOUR, S.A.: Pharmazie 34, 560 (1979)
- 149) TSCHESCHE, R., SCHMIDT, W. und WULFF, G.: Z. Naturforsch. 20b, 708 (1965)
- 150) MAHRAN, G.H., HILAL, S.H. und EL-ALFY, T.S.: Egypt. J. Pharm. Sci. 15(2), 149 (1974)
- 151) MAHRAN, G.H., HILAL, S.H. und EL-ALFY, T.S.: Egypt. J. Pharm. Sci. 15(2), 179 (1974)
- 152) VAN DER HAAR, A.W.: Chem. Ber. 54, 3142 (1921)
- 153) SCHEIDEGGER, J.-J. und CHERBULIEZ, E.: Helv. Chim. Acta 38, 547 (1955)
- 154) PASICH, B., TERMINSKA, K. und DEMCZUK, K.: Farm. Pol. 39(11), 657 (1983)
- 155) TRONCHET, J.: C. R. Acad. Sci. 258(8), 2390 (1964)
- 156) BERNARDI, R., CARDANI, C., GHIRINGHELLI, D. und SELVA, A.: Chim. Ind. (Milan) 52(6), 581 (1970)
- 157) MAHRAN, G.H., HILAL, S.H. und EL-ALFY, T.S.: Planta med. 27, 127 (1975)
- 158) WÖLTERS, B.: Dtsch. Apoth. Ztg. 106, 1729 (1966)
- 159) persönl. Mitteilung, Fa. Engelhardt, Frankfurt
- 160) FRÖHLING, D.: Pharmazie 24, 704 (1969)
- 161) HOSTETTMANN, K.: Helv. Chim. Act. 63, 606 (1980)
- 162) HESS, H.E., LANDOLT, E. und HIRZEL, R.: "Flora der Schweiz und angrenzender Gebiete", Birkhäuser Verlag, Basel (1970)
- 163) THIEME, H.: Pharmazie 19, 471 (1964)

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hildebert Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. Wagner für die Anregung zu dieser Arbeit, deren großzügige Förderung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. E. Jordan und ganz besonders Herrn Dr. R. Bauer, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre wertvollen Anregungen.

Herrn Dr. O. Seligmann, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die sorgfältige Durchführung der FAB-MS-, EI-MS- und GC-MS-Analysen.

Herrn Dr. G. Heubl, Institut für Botanik der Universität München, für die Beschaffung und botanische Bestimmung einiger Drogenmuster.

Herrn Prof. Dr. H. Thieme, Leipzig, für die freundliche Überlassung von Primulaverin.

Allen genannten Firmen für die Überlassung von Drogenmaterial, Extrakten und Fertigarzneimitteln.

Darüberhinaus möchte ich allen anderen Kolleginnen und Kollegen danken, die in verschiedenster Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Angelika für ihre große Hilfsbereitschaft und ihr stetes Verständnis.

Lebenslauf

Harald R e g e r

geboren am 18.6.1960 in
Dillingen/Donau
seit Juli 1986 verheiratet mit
Angelika Layh-Reger, Dipl.-Inf.

Eltern:

Georg Reger, Beamter und Hanne-
lore Reger, geb. Raps

Schulbildung:

1966/67 Volksschule Winthirstr.,
München
1967 - 70 Volksschule Schroben-
hausenerstr., München
1970 - 79 Erasmus-Grasser-Gymna-
sium, München, Mai 1979 Abitur

Wehrdienst:

Eintritt in die Bundeswehr als
Sanitätsoffiziersanwärter, Juli
1979

Studium der Pharmazie:

WS 79/80 bis WS 82/83 Ludwig-
Maximilians-Universität, München
2.Abschnitt der Pharm. Prüfung
April 1983

Pharmaziepraktikum:

Mai 83 bis Dez. 83 Apotheke zur
Münchner Freiheit, München

3.Abschnitt der Pharm.
Prüfung:

Juni 1984 in München

Approbation:

September 1984

Wissenschaftliche
Tätigkeit:

Januar 1984 Beginn der vorlie-
genden Arbeit unter Leitung von
Prof. Dr. H. Wagner am Institut
für Pharmazeutische Biologie der
Universität München

Studium der Lebensmittel-
chemie:

WS 84/85 bis SS 86 Ludwig-Maxi-
milians-Universität München,
1.Staatsexamen Dez. 1986

